

UNIVERSITY OF HAWAII  
LIBRARY  
JUN 24 '64

# ARCHIV FÜR MIKROBIOLOGIE

ZEITSCHRIFT FÜR DIE ERFORSCHUNG  
DER PFLANZLICHEN MIKROORGANISMEN

BEGRÜNDET VON  
J. BEHRENS · F. BOAS · A. RIPPEL

HERAUSGEGEBEN VON  
R. HARDER C. B. VAN NIEL R. NILSSON E. G. PRINGSHEIM  
GÖTTINGEN PACIFIC GROVE UPPSALA CAMBRIDGE  
A. RIPPEL-BALDES W. H. SCHOPFER H. TAMIYA  
GÖTTINGEN BERN TOKIO

SCHRIFTFÜHRUNG  
A. RIPPEL-BALDES R. HARDER  
GÖTTINGEN GÖTTINGEN

17. BAND · 2. HEFT

MIT 8 TEXTABBILDUNGEN  
(ABGESCHLOSSEN AM 12. MAI 1952)



BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG  
SPRINGER-VERLAG

1952

Per.  
QR 1  
Ar 25

Arch.  
Mikrobiol.

Das

**Archiv für Mikrobiologie**

steht Originalarbeiten und Sammelreferaten aus dem Gesamtgebiet der pflanzlichen Mikroorganismen offen. Arbeiten, die nur praktischen Zwecken dienen, scheiden aus, während im übrigen alle wissenschaftlichen Fragen aus „reinen“ und „angewandten“ Gebieten berücksichtigt werden.

Das „Archiv“ erscheint nach Maßgabe des eingehenden Materials. Der Preis des Bandes beträgt DM 96.—.

Der Autor erhält einen Unkostensersatz von DM 20.— für den 16 seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 30.— für eine Arbeit. Sammelreferate werden mit DM 40.— für den Druckbogen honoriert.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophoto u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihren Arbeiten 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Manuskripte erbeten an:

Prof. Dr. C. B. van Niel, California/USA, Pacific Grove, Stanford University, Hopkins Marine Station

Prof. Dr. R. Nilsson, Uppsala 7 (Schweden), Kungl. Lantbrukshögskolan, Mikrobiologiska Institution

Prof. Dr. G. Pringsheim, Cambridge/England, Botany School, Downing Street,

Prof. Dr. W. H. Schopfer, Bern/Schweiz, Botanisches Institut der Universität,

Prof. Dr. H. Tamiya, Tokio/Japan, 41, Mejiro-Machi 4th St., The Tokugawa Institute for Biological Research,

oder an die

*Schriftleitung:*

Prof. Dr. A. Rippel-Baldes, Göttingen, Institut für Mikrobiologie, Goßlerstr. 16

Prof. Dr. R. Harder, Göttingen, Pflanzenphysiolog. Institut, Nikolausberger Weg 18.

**Springer-Verlag**

Berlin · Göttingen · Heidelberg

**Vertriebsvertretung im Ausland:**

Lange, Maxwell & Springer Ltd., 41-45 Neal Street, London W. C. 2

17. Band

**Inhaltsverzeichnis.**

2. Heft

Seite

UHL, A., Beiträge zur Kenntnis der coliformen Bakterien nieder- und mittelprozentiger Biere und zur Klärung der Formenverwandschaft innerhalb der Coli-Aerogenes-Gruppe. I. Die coliformen Bakterien nieder- und mittelprozentiger Biere . . . . .	97
—, II. Zur Frage der Formen-Verwandschaft innerhalb der Coli-Aerogenes-Gruppe. Mit 1 Textabbildung . . . . .	124
JANKE, A., Die Wattehaube. Ein Verschuß für Kulturgefäße zur Züchtung streng aerober Mikroorganismen. Mit 1 Textabbildung . . . . .	155
PRAHLADA RAO, L. S., and M. K. SUBRAMANIAM, Somatic chromosomal reduction in yeast. With 4 figures in the text . . . . .	160
RIPPEL-BALDES, A., Die Energieausnutzung durch Mikroorganismen in quantitativer Hinsicht . . . . .	166
STOLP, H., Über das scheinbare Versagen des Tetrazoliumtestes bei <i>Bacterium coli</i> . Mit 2 Textabbildungen . . . . .	209



(Aus dem Institut für Gärungstechnik und Gärungsphysiologie  
der T. H. München/Weihenstephan.)

## Beiträge zur Kenntnis der coliformen Bakterien nieder- und mittelp Prozentiger Biere und zur Klärung der Formenverwandschaft innerhalb der Coli-Aerogenes-Gruppe<sup>1</sup>.

### I. Die coliformen Bakterien nieder- und mittelp Prozentiger Biere.

Von  
A. UHL.

(Eingegangen am 16. April 1951.)

Als die Verhältnisse der letzten Kriegs- und Nachkriegszeit die Brauindustrie zur Fertigung von schwächerprozentigen Bieren und Bierersatzgetränken zwangen und es sich hierbei herausstellte, daß solche Getränke häufig durch Kurzstäbchen vom Typ der in Brauerkreisen auch als „Termobakterien“ bezeichneten sogenannten „Würzebakterien“ verdorben wurden, wurde eine gründliche systematische Bearbeitung dieser technologischen Bakterien-Gruppe, die bis dahin systematisch noch wenig geklärt war, notwendig. Dies galt vor allem auch hinsichtlich der zu den *Coli-Aerogenes*-Bakterien gehörigen Vertreter dieser Gruppe, da einige Autoren [SCHWESCHNIKOWA (1941), CHEVALIER (1946) und HOM-PESCH (1947, 1949)] in Bier und Bierersatzgetränken auch *Coli*-Bakterien oder *coli*-ähnliche Formen nachgewiesen hatten, und weil von letzterem auf Grund seiner oft sehr ungünstig zu beurteilenden Colititer-Befunde die Ansicht vertreten wurde, daß die Forderung einer hygienisch-bakteriologischen Prüfung für Bier und Bierersatzgetränke genau so Geltung habe wie für Trinkwasser, bei dem die Anwesenheit von Colibakterien auf eine fäkale Verunreinigung mit der Möglichkeit einer Verbreitung von Krankheitserregern schließen lasse. Die Notwendigkeit eines Coli-Nachweises in Bier schien HOM-PESCH überdies dadurch noch besonders bewiesen, daß nach seinen Befunden *Typhus*- und *Paratyphus*-Bakterien — bei entsprechend hoher Einsaatmenge — z. B. in 8% igem Bier unter Bedingungen, wie sie die natürlichen Betriebsverhältnisse bieten, eine beträchtlich lange Lebensfähigkeit von etwa 8 Wochen aufweisen.

In Ergänzung zu den neueren systematischen Untersuchungen von OLSEN und POULSEN (1948), die in Würze und gärender Würze Vertreter der 5 Genera *Aerobacter*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* und *Achromobacter* feststellten, bemühte sich schließlich HELM (1949) um eine weitere Aufgliederung der zur

<sup>1</sup> Gekürzte Wiedergabe einer Habilitationsschrift, die 1950 bei der T. H. München eingereicht wurde.

*Coli-Aerogenes*-Gruppe gehörenden Formen der „Würzebakterien“. Dieser Forscher konnte bei der Durchführung von laufenden Betriebskontrollen in Brauereien aus Reinigungswasser, Würze, gärender Würze, Bier und Tank-Geläger ein reichhaltiges Material aus Lactose gas- und säureproduzierender Bakterien herauszüchten. Zu einem Teil konnten diese von ihm, entsprechend ihrem Verhalten in den Imvic-Testen, als *Esch. coli*, *Esch. freundii* und *Aerob. aerogenes*, je mit indol-positiven und indol-negativen Typen vertreten, bestimmt werden.

Durch diese Untersuchungen von HELM ist die systematische Aufgliederung der in Würze und Bier vorkommenden *Coli-Aerogenes*-Formen zweifellos besonders gefördert worden. Jedoch mußte sich dieser Autor, der übrigens ebenfalls für die Durchführung einer besonderen hygienischen Betriebsüberwachung — allerdings in abgewandelter Form — durch Vornahme eines *Coli-Aerogenes*-Nachweises eintritt, bei seinen Kontrollarbeiten begreiflicherweise auf die wichtigsten zur Typendifferenzierung nötigen Teste beschränken. So fehlt bei seinen Untersuchungen z. B. auch der Versuch einer Scheidung der gefundenen fäkalen Typen in solche vom Warmblüter- bzw. Kaltblüterdarm stammende. Wirklich notwendig wäre die Einführung einer besonderen hygienischen Überwachung der Betriebserzeugnisse — in Anlehnung an die Problematik bei der Trinkwasserbewertung — letzten Endes aber nur bei häufigerem Vorkommen von aus Warmblüterdarm stammenden *Coli*- und *Paracoli*-Keimen fäkalen Ursprungs. Nur diese sind als typische Leitorganismen von Verunreinigungen anzusehen, welche die Gefahr der Verbreitung von Seuchenerregern der *Typhus-Paratyphus-Enteritis*-Gruppe in sich bergen.

Eine eingehende Beschreibung und systematische Bearbeitung unter Erfassung einer Vielzahl von morphologischen, kulturellen und biochemischen Eigenschaften ist also bislang bei diesen in Würze und Bier nachweisbaren Typen der *Coli-Aerogenes*-Gruppe noch nicht vollwertig vorgenommen worden, dürfte aber zweifellos eine weitere Grundlage zur Beurteilung der hygienischen und technologischen Bedeutung dieser Bakterien für den Brauereibetrieb bilden. Vorliegende Arbeit soll daher eine möglichst weitgehende Aufgliederung der aus Bier isolierbaren Bakterien dieser Gruppe bringen. Darüber hinaus sollen die erzielten Ergebnisse noch zur Klärung der Formen-Verwandtschaft innerhalb dieser Gruppe ausgewertet werden.

## A. Methodik.

### 1. Die Isolierung und Reinzüchtung der Stämme.

Die untersuchten Stämme wurden aus 22 Proben 2%igem Bier (einschl. 1 Probe gärender Würze) und 19 Proben 8%igem Bier (einschl. 2 Proben 5,5% Bier) isoliert. Die Proben stammten von Klein-, Mittel- und Großbrauereien der verschiedensten Gegenden Süd- und Westdeutschlands.



Die Isolierung und Reinigung der Stämme erfolgte jeweils über 5 Endo-Agarplatten im Anschluß an die Anreicherungskultur in Galle-Gentianaviolett-Lactose-Bouillon. Je eine Kolonie der auf jeder ersten Endo-Platte gewachsenen verschiedenartigen Kolonie-Typen wurde jeweils abgeimpft und über eine Serie von 4 weiteren Endo-Agarplatten, unter jeweiliger Zwischenschaltung von 2—3 Std alten Stand.II-Bouillonkulturen (Merck) zwischen den Ausstrichplatten, vor der Ausführung weiterer Untersuchungen „gereinigt“. Die Kulturtemperatur betrug 37° C. Hierdurch war den Forderungen, wie sie RUCHHOFF und Mitarbeiter (1931) zur Erreichung reiner Stämme bei der Isolierung von *Coli*-Bakterien aufzeigte, in vollstem Maße Genüge getan, so daß am Ende dieses Reinigungsganges das Vorliegen reiner Stämme angenommen werden durfte. Auf diese Weise wurden insgesamt 69 coliforme Stämme isoliert, die zur weiteren Verfügung für die geplanten Untersuchungen laufend auf Stand.I-Agar (Merck) weitergezüchtet wurden.

Stämme aus 2%igem Bier sind in den Tabellen mit einem großen Buchstaben und einer arabischen Ziffer als Index bezeichnet (z. B. B4). Von diesen sind jeweils die buchstabengleichen Stämme aus ein und derselben Probe isoliert worden. Stämme aus 8%igem Bier (einschl. 2 Pr. 5,5% Bier) sind durch eine arabische Ziffer mit einem kleinen Buchstaben als Index gekennzeichnet (z. B. 1a). In diesem Falle stammen jeweils ziffern-gleiche Stämme aus derselben Probe.

## 2. Die Ermittlung der morphologischen, kulturellen und biochemischen Eigenschaften der Stämme.

Die Bestimmung der Stämme und Charakterisierung ihrer morphologischen, kulturellen und biochemischen Eigenschaften wurde folgendermaßen durchgeführt:

Gramfärbung: Nach der Methode von HUCKER (n. DORNER, 1933) mit 16 bis 18 Std alten, bei 30° C gewachsenen St.I-Agar-Strichkulturen. — Sporenbildungsnachweis: 3—4 Wochen alte, bei 30° C bebrütete Kartoffelkulturen. — Feststellung der Beweglichkeit und Art der Begeißelung: Geißelfärbung nach CASARES-GIL (DORNER, l. c.), bei späterer Wiederholung. An Stämmen, die sich dabei als nicht begeißelt erwiesen, wurde im Quetschwasser junger St.I-Bouillon-Kulturen, sowie in 16—18 Std alten St.II-Bouillon-Kulturen die Beweglichkeit im Dunkelfeld nachgeprüft. Kulturtemperatur jeweils 30° C. — Gelatineverflüssigung: Stichkulturen in Bouillongelatine, bei Zimmertemperatur aufgestellt; Beobachtungszeit 60 Tage. — Kulturelles Verhalten: Nährbouillon, Nährgelatine und Nähragar, sowie der zur präsumptiven Typen-Differenzierung dienende Fuchsin-Lactose-Agar nach ENDO und der Eosin-Methylenblau-Lactose-Agar (E.M.B.) nach LEVINE wurden jeweils nach den dafür üblichen Standardvorschriften (DORNER, l. c.) angefertigt und bebrütet. — Indolbildung: Nachweis in der Nährlösung nach NEISSER-FRIEBER (OLSZEWski und SPITTA, 1931) in Verbindung mit dem Reagens nach KOVACS (1928), sowie in der Nährlösung nach GERSBACH (OLSZ. u. SP. l. c.) in Verbindung mit dem Reagens nach GOTTSACKER (1933). Die Ergebnisse stimmten miteinander überein. Spätere Wiederholungen mit St.II-Bouillon (Merck), womit gleich gute Ergebnisse erzielt wurden. Bebrütung bei 37° C während 2 Tagen, bei negativem Befund bis zu 4 Tagen. — Methylrot- und VOGES-PROSKAUER-Probe: Standardisierte Nährlösung nach CLARK und LUBBS (DORNER, l. c.). Bebrütung 4 Tage bei 37° C. VP-Probe nach BUNKER, TUCKER und GREEN (1918), zeitweise parallel hierzu auch nach DORNER und HELLINGER (1935), jedoch ohne besondere Vorteile. Beobachtungszeit für die Farbreaktion in den Uhrschildchen bis zu 24 Std. Die beste Farbtiefe war meist nach 4—6 Std erreicht. —



**Citrat-Probe:** In der KOSERSCHEN Nährlösung (OLSZEWSKI und SPITTA, 1931) bei 37° C. Negative Befunde wurden bei 25° C nachgeprüft. Beobachtungszeit 12 Tage. — **Nitratreduktion:** Nach der Vorschrift von DORNER (l. c.). — **N-Quellen-Verwertung:** Als alleinige N-Quellen wurden Harnsäure, Uracil und Harnstoff in synthetischer Nährlösung nach MITCHELL und LEVINE (1938) geprüft. Sterilisation durch E.K.-Filtration mittels Seitz-E.K.-Filter (in Ur-Vorschrift: Chamberlandkerzen L 3). Bebrütung 7 Tage bei 30° C (Ur-Vorschrift 5 Tage). — **Fermentierung vergärbbarer Substanzen:** Grundsubstrat war eine durch zwei besonders fermentstarke Versuchsstämme vorvergorene St.I-Bouillon (Merck) von  $p_H$  6,8 mit jeweils 0,5% vergärbbarer Substanz. Kultur in DURHAM-Röhrchen bei 37° C, in besonderen Fällen bei 25° C. Beobachtungszeit bis zu 10 Tagen. Messung der  $p_H$ -Werte mittels Lyphanstreifen. — **EIJKMANSche Probe:** Abwandlung nach BULÍR (1907) mit Mannit-Neutralrot-Bouillon bei 45° C. — **H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>-Verhältnis:** Ermittlung durch Vergärung von Glucosebouillon in kalibrierten EINHORN-Röhrchen bei 37° C nach herkömmlichem Verfahren (DEMETER, 1941, p. 522). — **Verhalten in Lackmusmilch:** Kultur in einfacher Lackmusmilch (DEMETER, 1941, p. 521) 21 Tage bei 37° C. — **H<sub>2</sub>S-Bildung:** Stichkulturen in Pepton-Eisenagar nach TITSLER und SANDHOLZER (1937), bei 30° C bebrütet. Als Ersatz des nicht beschaffbaren Bacto-Tryptons amerikanischer Herkunft diente WITTE-Pepton. — **Neutralrotreduktionsprobe:** Nährboden von ROTHBERGER-SCHEFFLER, modifiziert nach OLDEKOP (OLSZEWSKI und SPITTA, 1931). In späteren Versuchsreihen Neutralrot-Mannitbouillon nach BULÍR in Verbindung mit der Mannitgärprobe. Bebrütung 4 Tage bei 37° C, wenn negativ, bei 25° C. — **Impfmateriäl:** Sämtliche Nährsubstrate wurden vor ihrer Beimpfung einige Tage lang durch Bebrütung bei 37° C auf Sterilität geprüft. Im Falle der N-Quellen-Prüfung Impfung mit Aufschlammungen etwa 24 Std alter Nähragar-Strichkulturen in physiologischer Kochsalzlösung, in allen anderen Fällen mit etwa 24 Std alten St.II-Bouillon-Kulturen.

## B. Klassifizierung der Stämme auf Grund der ermittelten morphologischen, kulturellen und biochemischen Eigenschaften.

### 1. Allgemeine Charakterisierung der Stämme.

Alle Stämme gehörten dem unbeweglichen oder mit peritrichen Geißeln beweglichen, geraden Kurzstäbchentyp an und erwiesen sich in jüngeren wie in älteren Kulturen als eindeutig gramnegativ. Die Reduktion von Nitrat zu Nitrit war von sämtlichen Stämmen mit gleichmäßiger Intensität schon nach 48 Std Kulturdauer vollzogen. Sporenbildung trat in keinem Falle auf. — Die sonstigen morphologischen Befunde und die kulturellen Eigenschaften in St.I-Bouillon, auf St.I-Agar und auf Kartoffelscheiben zeigten teils große Einheitlichkeit, teils schlecht unterscheidbare Übergänge mit wenig differenzierendem Wert und hielten sich im übrigen in dem für *Coli-Aerogenes*-Bakterien charakteristischen Eigenschaftsbereich, so daß auf eine besondere Mitteilung derselben verzichtet werden kann. Gelegentlich aufgetretene Besonderheiten werden im einzelnen bei der Tabellenbesprechung Erwähnung finden. — Mit Ausnahme von 3 Stämmen in Tab. 4 (T 33, T 34 und 4b) fermentierten alle übrigen außer Glucose und verschiedenen anderen C-Quellen, auch Lactose unter Gas- und Säurebildung.

Auf Grund dieser Befunde können die Stämme — abgesehen vorläufig von T 33, T 34 und 4b — auf alle Fälle der *Coli-Aerogenes*-Gruppe zugeordnet werden, denn sie sind kurze und gerade, gramnegative Stäbchen, unbeweglich oder mit peritrichen Geißeln beweglich, bilden keine Sporen und reduzieren Nitrat zu Nitrit. Sie gedeihen in künstlichen



*Zeichen-Erklärung für Tab. 1—4 und 1a —4a.*

1. Im allgemeinen bedeutet:

+	positiver Befund
(+)	geringe Einschränkung des positiven Befundes
(+)	deutliche „ „ „ „ „ (intermed. Reak.)
(+)	starke „ „ „ „ „ (mäß. posit. Reak.)
(—)	negativer Befund mit schwach positivem Einschlag
(—)	„ „ „ „ „ sehr schwach positivem Einschlag
—	negativer Befund
R	vollständige Reduktion des betreffenden Farbstoffs
R)	nicht ganz vollständ. — mittelmäß. Redukt. d. betreff. Farbst.
(R)	mäßige Reduktion d. betreff. Farbst.

Zeichen übereinander (desgl. Zahlen) bedeuten:

oberes Zeichen:	entsprech. Reaktion tritt häufiger auf	} bei wie- derholter Prüfung
unteres Zeichen:	„ „ „ „ wenig. häufig auf	

2. Im besonderen bedeutet:

MR:	+	pH 5,0 u. darunter	VP:	+	sehr starke Reaktion
	(+)	pH 5,1—5,2		(+)	noch zieml. kräft. Reak.
	(+)	pH 5,3—5,4		(+)	mittelmäßige Reaktion
	(—)	pH 5,5—5,6		(—)	mäßige Reaktion
	(—)	pH 5,7—5,8		(—)	schwache Reaktion
	—	pH 5,9 u. darüber		(—)	sehr schwache Reaktion
		Anfangs-pH: 7,0		—	negative Reaktion

Zeichen übereinander: s. unter 1.

Harnstoff:	'	nach Säuerung (Indikat. gelb) halbe Umkehr d. Reak. (Ind. grün)
	!	nach „ „ „ „ „ ganze „ „ „ „ (Ind. blau)

C-Quelle:	—	bei 37° C u. 25° C keine Fermentierung (weder Gas- noch Säurebildung)
	(—)	bei 37° C und 25° C höchstens nur dauernd stark verzögerte, schwache Fermentierung (ohne sichtbar feststellbare Gas- u. Säurebildung)

Säurebildung/

+	bei 37° C	kräftige Gas- u. Säurebildung
+	bei 37° C	Säurebildung normal, Gasbild. etwas eingeschränkt
(+)	bei 37° C	„ „ „ „ „ mittelmäß. — mäßig
S+	bei 37° C	teils nur Säurebildung, teils Gas- u. Säurebildung
S	bei 37° C u. 25° C	nur Säurebildung
(S)	bei 37° C u. 25° C	nur mittelmäßige — mäßige Säurebildung
[S]	bei 37° C u. 25° C	nur schwache — sehr schwache Säurebildg.
.	rechts neben einem Zeich.	bedeutet: entspr. Fermentierung erst n. kürz. Gewöhnung.
:	„ „ „ „ „	entsprech. Fermentierung erst n. läng. Gewöhnung.
oberes Zeich.	} nicht wie unt. 1., sondern:	ober. Z.: Befund bei 37° C
unteres Zeich.		unt. Z.: Befund bei 25° C

Lackm. Milch:	S	Säurebildung findet statt
	co	Coagulation findet statt (z. B. co Coagulation nach 4 Tagen Bebrütung)
	g	vorübergehend Coagulation, dann wieder Verflüssigung

Bulir 45° C:	+	Gas- u. Säurebildung
		Zahl (z. B. 5,7): nur Säurebildung, pH = 5,7; (Anfangs-pH: 6,8)
		Zeichen u. Zahl übereinander: s. unter 1

H <sub>2</sub> S-Bildung:	++	sehr stark positive Reaktion
	+	deutlich positive Reaktion

Nährmedien gut, fermentieren Glucose und Lactose unter Bildung von Säure und sichtbarem Gas.

Nach dieser Feststellung soll im folgenden an Hand einer Gegenüberstellung der Stämme in den Tab. 1—4 hinsichtlich ihrer sonstigen Merkmale die weitere Differenzierung erfolgen und versucht werden, die Stämme in das BERGEYSche System (1948) einzureihen. Den Tabellen sei eine Erklärung der Zeichen vorausgeschickt (siehe Seite 101).

Tabelle 1. (Fortsetzung siehe gegenüberliegende Seite).

Gruppe	Stämme	Beweglichkeit Gel. Verfl.	37° C				Harnsäure			Mannit	Glucose	Lactose	Saccharose	Salicin	Dulcitol	Inositol
			Indol	M. R.	V. P.	Citrat	Harnsäure	Uracil	Harnstoff							
A	H 27	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
	K 18	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
	18a	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
	9b	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	[S]
	2c	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	[S]
	1c	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	[S]
	U 37	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	[S]
	H 29	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	[S]
	G 11	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	[S]
	7b	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	[S]
	B 5	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
	V 31	—	+	—	—	+	+	—	—	+	+	+	—	+	+	—
	V 32	—	+	—	—	+	+	—	—	+	+	+	—	+	+	—
B	G 12	+	+	—	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
	B 4	+	+	—	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
	B 6	+	+	—	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
	M 24	+	+	—	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
	8b	+	+	—	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
	U 36	+	+	—	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
	J 14	+	+	—	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
	R 22	+	+	—	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
	3a	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
	4a	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
	D 9	+	+	—	(+)	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—
	7a	+	+	—	(+)	+	+	—	—	+	+	+	—	+	+	—



## 2. Klassifizierung der Stämme in Tab. 1.

Die Stämme in Tab. 1 unterscheiden sich von allen übrigen untersuchten Stämmen durch die Eigenschaft, Bouillon-Gelatine langsam zu verflüssigen, ein Verhalten, das innerhalb des Tribus *Escherichae* nur für die Art *Aerob. cloacae* besonders charakteristisch ist. Außerdem sind sie — mit der geringen Ausnahme der Stämme V 31, V 32 und 4a — beweglich.

Tabelle 1. (Fortsetzung von vorheriger Seite).

Adonit	Glycerin	Cellobiose	Rafinose	Maltose	Xylose	$\alpha$ -Meth.	Inulin	Lackm. Milch	Säure Coagul.	Lackm. Red.	Neutr. Red.	$H_2:CO_2$	Bulir 45° C (Eijk.)	Red.	Gas od. pH	Wachstum	$H_2S$ -Bldg.
+	[S]	+	+	+	+	+	—	S	CO <sub>9</sub>	R	R	1:2,4	—	5,3	befr	++	
+	[S]	+	+	+	+	+	—	S	CO <sub>11</sub>	R	R	1:1,7	—	5,4	befr	++	
—	[S]	+	+	+	+	+	—	S	CO <sub>3</sub>	R	R	1:1,1	—	5,2	mäß	++	
—	[S]	+	+	+	+	+	—	S	CO <sub>4</sub>	R	R	1:1	—	5,2	befr	++	
—	[S]	+	+	+	+	+	—	S	CO <sub>9</sub>	R	R	1:1,2	—	5,5	befr	++	
—	[S]	+	+	+	+	+	—	S	CO <sub>5</sub>	R	R	1:1,3	—	5,3	befr	++	
—	[S]	+	+	+	+	+	—	S	CO <sub>11</sub>	R	R	1:1,5	—	5,2	befr	++	
—	[S]	+	+	+	+	+	—	S	CO <sub>7</sub>	R	R	1:1,6	—	5,3	bcfr	++	
—	[S]	+	+	+	+	+	—	S	CO <sub>4</sub>	R	R	1:1,4	—	5,2	befr	++	
—	[S]	+	—	+	+	+	—	S	CO <sub>11</sub>	R	R	1:1,1	—	5,4	befr	++	
—	[S]	+	—	+	+	—	—	S	CO <sub>11</sub>	R	R	1:1,2	—	5,6	mäß	++	
—	[S]	+	—	+	+	+	—	S	—	R)	R	1:1,3	—	5,9	mäß	+	
—	[S]	+	—	+	+	+	—	S	CO <sub>14</sub>	R	R	1:1,2	—	5,9	mäß	+	
—	(S)	+	+	+	+	(+)	—	S	CO <sub>7</sub>	R	R)	S	—	—	—	+	
—	(S)	+	+	+	+	—	—	S	CO <sub>3</sub>	R	R)	S	—	—	—	+	
—	(S)	+	+	+	+	—	—	S	CO <sub>3</sub>	R	R)	S	—	—	—	+	
—	(S)	+	+	+	+	—	—	S	CO <sub>7</sub>	R	R)	1:1,3	—	—	—	+	
—	[S]	+	+	+	+	—	—	S	CO <sub>4</sub>	R	R)	1:1,5	—	—	—	+	
—	(S)	+	+	+	+	(+)	—	S	CO <sub>5</sub>	R	R)	1:1	—	—	—	+	
—	(S)	+	+	+	+	—	—	S	CO <sub>5</sub>	R	R)	S	—	—	—	+	
—	(S)	+	+	+	+	—	—	S	CO <sub>5</sub>	R	R)	2:1	—	—	—	+	
—	(S)	+	+	+	+	(+)	—	S	CO <sub>2</sub>	R	R)	1:1 1:2	—	—	—	+	
—	(S)	+	+	+	+	+	—	S	CO <sub>2</sub>	R	R)	1:3	—	—	—	+	
—	[S]	+	+	+	+	+	—	S	CO <sub>6</sub>	R	R)	1,3:1	—	5,9	mäß	+	
—	[S]	+	—	+	+	+	—	S	CO <sub>18</sub>	R	R)	1,4:1 1:1,4	—	—	—	++	

Ein weiteres gemeinsames, für *Aerob. cloacae* spezifisches Charakteristikum dieser Stämme ist auch die Art ihrer Glycerinvergärung. Sie alle entwickeln in Glycerinbouillon kein oder nur Spuren von sichtbarem Gas. Die Säurebildung ist dabei durchwegs auffallend gering und wird durch die alkalischen Stoffwechselprodukte des N-Stoffwechsels bei allen Stämmen so neutralisiert, daß in den Kulturen gewöhnlich für längere Zeit ein  $p_H$ -Wert um den Ausgangswert 6,8 erhalten bleibt. Im Gegensatz hierzu ist bei Nichtverwertung einer C-Quelle im Substrat meist schon nach einigen Tagen jeweils ein  $p_H$ -Wert von 7,8 bis 8,3 festzustellen.

Im übrigen mag bezüglich der C-Quellen-Verwertung im einzelnen lediglich noch darauf hingewiesen werden, daß einigen Stämmen — in den Tabellen durch entsprechende Zeichen gekennzeichnet — eine etwas verzögerte Lactosevergärung eigen ist. Nach genügend langer Kultur oder Gewöhnung fermentieren sie jedoch diesen Zucker auf ganz normale Weise. Diese Erscheinung ist also der für *Paracoli*-Stämme typischen „konstant verzögerten oder fehlenden Lactose-Vergärung“ nicht gleichzusetzen.

Zur tabellenmäßigen Einordnung der Stämme dienten — in Anbetracht ihrer besonderen Bedeutung für die Klassifizierung der *Coli-Aerogenes*-Bakterien — in erster Linie die Ergebnisse der Imvic-Reaktionen; diese waren jeweils in mehrfachen Versuchen während der ersten 3—5 Monate nach erfolgter Isolierung der Stämme wiederholt worden. Danach scheiden sich die Stämme in die 2 Gruppen A und B. Die für die Art *Aerob. cloacae* charakteristische „Imvic-Reaktionskombination“ (IRK) — — ++ war nur für die unter A zusammengefaßten Stämme H 27—V 32 in wiederholten Versuchen konstant, während bei allen übrigen unter B aufgeführten Stämmen die Methylrotreaktion (MR.) in den verschiedenen Versuchen teils negativ, teils positiv war, so daß für sie in der Tabelle sowohl die JRK — — ++, als auch jene mit der Bewertung — ++ + verzeichnet ist. Damit bezeugen die Stämme in Gruppe B intermediären Charakter.

Auch durch die Eigenschaft einer unterschiedlichen Reduktionskraft gegenüber Neutralrot werden die Stämme in die beiden Gruppen A und B geschieden, und in den Ergebnissen des  $H_2:CO_2$ -Verhältnisses drückt sich diese Gruppentrennung ebenfalls in gewissem Sinne aus. Während bei den A-Stämmen ziemlich einheitlich die Kohlensäure gegenüber dem Wasserstoff überwiegt, was als *Aerobacter*- und damit *cloacae*-typisch gilt, verhalten sich die B-Stämme sehr uneinheitlich und zeigen teilweise eine gewisse Tendenz zur Bildung der Gase in umgekehrtem Verhältnis bzw. zur Nur-Säureproduktion. Schließlich trennt auch noch die ELJKMANSche Probe (in BULIRS Substrat bei 45° C) in die beiden Gruppen A und B. Reduktion und Gasbildung findet hier in keinem Falle statt, wohl aber Wachstum und Säuerung in Gruppe A, wobei V 31 und V 32 sich in dieser Beziehung allerdings etwas schwankend verhalten. Die Stämme in Gruppe B dagegen — ausgenommen D 9 — geben eine vollkommen negative ELJKMAN-Probe.

Schwefelwasserstoff wird von allen Stämmen gebildet, die Intensität ist in Gruppe A jedoch etwas stärker als in Gruppe B.

Zum Nachweis der Schwefelwasserstoffbildung muß erwähnt werden, daß die Ergebnisse nicht gleichzeitig mit denen der übrigen Teste, sondern erst später nach einigen Monaten gewonnen wurden, da das zur Bereitung des hierfür spezifischen Nährbodens gebräuchliche Bacto-Trypton zu Beginn der Versuche nicht zur Verfügung stand. Auch später konnte es nicht mehr beschafft werden und mußte daher durch Witte-Pepton ersetzt werden. Der Indicator (Ferri-Ammonium-Citrat), der für die



Empfindlichkeit der Reaktion in erster Linie spezifisch ist, und die übrige Zusammensetzung des Nährbodens waren natürlich gleich, wie in der von TITSLER und SANDHOLZER (1937) angegebenen Vorschrift. Daß Witte-Pepton anstatt Bacto-Trypton ein zu empfindliches Nährsubstrat für den Nachweis des  $H_2S$ -Bildungsvermögens der *Coli-Aerogenes*-Bakterien sei und nur aus diesem Grunde auch die *Cloacae*-Typen, die nach BERGEY eigentlich  $H_2S$ -negativ sein sollten, ein  $H_2S$ -positives Verhalten zeigten, ist in Anbetracht der Versuchsergebnisse, die mit anderen Stämmen erzielt wurden, kaum anzunehmen. Wie aus den später zu besprechenden Tabellen hervorgeht, zeigten nämlich verschiedene Intermediär-Formen und die *Esch. coli*-Stämme in diesem Indicator-Nährboden mit Witte-Pepton keine  $H_2S$ -Bildung.

Auf Endo-Agar<sup>1</sup> haben die Stämme der Gruppe A ein für *Aerob. cloacae* charakteristisches Kolonie-Aussehen. Meist werden flach-erhabene, mittelgroße, feuchtglänzende und etwas durchscheinende, zarte Kolonien mit blaßrosa-milchiger Färbtönung gebildet. Fuchsinglanz tritt nie auf. Abweichend davon sind die Kolonien der Stämme der Gruppe B etwas weniger durchscheinend und häufiger nicht rund, sondern mit unregelmäßig ausgebildetem, und zum Teil — wenn älter — wallartig aufgeworfenem, gefaltetem Rand versehen. Außerdem variieren sie in der Färbtönung sehr stark zwischen rosa — hellrot — dunkelrot, wobei aber fast immer ein milchiger Ton die Farbtiefe dämpft oder wenigstens eine hellere, milchig-rote Randzone einen dunkleren Kern umgibt. Das Auftreten von Fuchsinglanz ist variabel, wie durch öftere Wiederholungen festgestellt werden konnte. Einmal fehlt ein solcher ganz, dann tritt er wieder sehr stark auf, dazwischen kommen alle Übergänge vor, und zwar bei ein und demselben Stamm. Läßt man nach der 37° C-Kultur die Platten bei Zimmertemperatur noch stehen, so verschwindet der Fuchsinglanz teilweise wieder und die Kolonie-Farbe wird gewöhnlich aufgehellt. — Die Stämme V 31, V 32 und D 9 wachsen auf St.I-Nähragar und auf Kartoffelscheiben mit deutlicher Gelbfärbung.

Nach dem BERGEYSchen System dürften die Stämme der Gruppe A auf Grund der gefundenen Ergebnisse ohne Bedenken als zu *Aerob. cloacae* zugehörig anzusehen sein. Allerdings bilden sie, entgegen den BERGEYSchen Angaben,  $H_2S$ .

Im Zusammenhang damit muß nun darauf hingewiesen werden, daß BERGEY einige der *Coli-Aerogenes*-Gruppe sehr nahestehende, für Pflanzen aber pathogene Formen in seinem Tribus *Erwineae* untergebracht hat. So erscheinen u. a. dort auch zwei  $H_2S$ -bildende *cloacae*-ähnliche Arten: *Erw. betivora* und *Erw. carnegiana*. In welchem Indicatormedium von diesen  $H_2S$  gebildet wird, ist allerdings aus den Angaben nicht ersichtlich. Die MR-, VP- und Citrat-Teste sind für sie in der Beschreibung leider auch nicht angegeben. Die weitere Beschreibung bei BERGEY stimmt aber mit den Eigenschaften vorliegender Stämme so weitgehend überein, daß diese jenen mindestens so nahestehend erscheinen wie der Art *Aerob. cloacae* und daher genau so gut mit ihnen zusammen in die Gattung *Erwinia* gestellt werden könnten.

Vom phylogenetischen Standpunkt aus betrachtet, wäre aber eine solche Zuordnung zweifellos abwegig, da dadurch wieder weitere *Coli-Aerogenes*-Formen in ein fremdes Genus kämen. Zwingende praktische Gesichtspunkte für eine solche Zuteilung liegen aber insofern auch nicht vor, als die in Rede stehenden Formen ja schließlich gar nicht von krankem Pflanzengewebe isoliert wurden, wenngleich die Möglichkeit ihres eventuell pflanzenpathogenen Auftretens deshalb trotzdem offen bleiben mag.

<sup>1</sup> Die diesbezüglichen Ergebnisse wurden aus Raumsparnis in den Tabellen nicht eigens angeführt.

So erscheint es also viel folgerichtiger, solche  $H_2S$ -bildende *Aerob. cloacae*-Formen, unbeschadet ihres pflanzen-pathogenen oder -nichtpathogenen Charakters, gemeinsam als  $H_2S$ -bildende Unterarten von *Aerob. cloacae* in der Gattung *Aerobacter* zu führen, wobei eine gegebenenfalls vorhandene Pflanzenpathogenität als Varietätsmerkmal benützt werden mag. Damit stellt sich Verfasser in Übereinstimmung mit WALDEE (1945), der ebenfalls für eine Umgliederung atypischer Formen der Gattung *Erwinia* in entsprechend andere Gattungen eintritt.

Im Falle der Stämme V 31 und V 32 liegen außer der positiven  $H_2S$ -Bildung noch 2 weitere für *Aerob. cloacae* unstimmmige Eigenschaften vor. Einmal zeichnen sich diese beiden Stämme durch Unbeweglichkeit aus. Sodann verwerten sie Harnsäure als alleinige N-Quelle nicht, die hingegen *Aerob. cloacae* nach BERGEY verwerten soll. Dies ist bei der Identifizierung dieser Stämme mit dieser Art zu berücksichtigen.

Das Verhalten im Uracil-Medium wird bei BERGEY im Falle *Aerob. cloacae* nicht berücksichtigt und kann daher übergangen werden. Dies gilt außer für V 31 und V 32 auch für den Stamm K 18. Gleichwohl gibt es zu bedenken, daß nach den Befunden von MITCHELL und LEVINE (1938) durch *Cloacae*-Formen eigentlich alle 3 untersuchten N-Quellen verwertet werden müßten.

Die in Gruppe B stehenden Typen könnten auf Grund ihrer variablen oder zum Teil sogar konstant positiven MR-Teste sowie auf Grund ihrer positiven Citrat- und  $H_2S$ -Reaktionen am ehesten zu der Art *Esch. freundii* gestellt werden. In klassischer Form gilt für diese jedoch die IRK —+—+.

Bei der Beschreibung von *Esch. freundii* erwähnt BERGEY zwar auch das Vorkommen von MR-positiven Intermediär-Stämmen mit positiver VP-Reaktion. Mit BARRITTS  $\alpha$ -Naphthol-Reagens (1936/37) gelingt es nämlich, bei Intermediärformen noch Spuren von Acetylmethylcarbinol nachzuweisen, die durch die weniger empfindliche Standard-Methode (Soc. Amer. Bact. 1937) nicht mehr zu entdecken sind. Bemerkt sei hier aber ausdrücklich, daß die hier vorliegenden Ergebnisse sogar mit dieser weniger empfindlichen, sogenannten Uhrschildchen-Methode nach BUNKER, TUCKER und GREEN (l. c.) gewonnen wurden.

Die Fähigkeit einer Intermediärform zur Acetoin-Bildung (pos. VP-Reaktion) deutet nun, worauf übrigens auch BERGEY hinweist, zweifellos eine nähere Verwandtschaft zu *Aerobacter* als zu *Esch. coli* an. Es dürfte demnach, da *Esch. freundii* in der Gattung *Escherichia* und dadurch in der näheren Verwandtschaft von *Esch. coli* steht, meines Erachtens nicht angängig sein, solche wie die hier gefundenen Intermediär-Typen mit ausgesprochen positiver VP-Reaktion *Esch. freundii* zuzuordnen, da hierdurch fälschlicherweise diese Formen durch eine nähere Verwandtschaft zu *Esch. coli* als durch eine solche zu *Aerobacter* charakterisiert wären, was ihrer Fähigkeit, Acetoin zu bilden, entgegensteht.

Im übrigen scheint auch noch aus anderen Gründen für diese Intermediärformen eine solche Zuordnung nicht zulässig zu sein. Auf Grund der für *Esch. freundii* hinsichtlich der Gelatineverflüssigung ziemlich auseinandergehenden Befunde der verschiedenen Autoren (s. BERGEY, l. c.) würden sich zwar hiergegen weniger Bedenken erheben, jedoch trifft dies in vermehrterem Maße für zwei andere Faktoren zu.



Einmal für die Art der Glycerinverwertung, die abweichend von *Esch. freundii* bei diesen Formen *cloacae*-typisch ohne Auftreten von sichtbarem Gas erfolgt und deshalb die hier in Frage stehenden Intermediärtypen in nahe Verwandtschaft zu *Aerob. cloacae* stellt. Weiterhin verwertet *Esch. freundii* Harnsäure als alleinige N-Quelle nicht, im Gegensatz zu den in Gruppe B stehenden Typen, ausgenommen allerdings Stamm D 9 und 7a. Diese beiden könnten also mit *Esch. freundii* notfalls identifiziert werden, wenn wir von der abweichenden Art der Glycerinverwertung und dem positiven Verhalten in der VP-Probe als störendes Moment absehen wollten, wobei dann D 9 als gelbe Variante dieser Art zu werten wäre.

In Anbetracht der sich aus obigen Überlegungen ergebenden Unsicherheit, die Stämme in Tab. 1 in das BERGEYSche System eindeutig einordnen zu können, mag daher deren allgemeine Charakterisierung folgendermaßen umrissen werden:

Die Stämme H 27—G 11 mit den Imvic-Symbolen — — + + sind Formen einer H<sub>2</sub>S-bildenden Unterart von *Aerob. cloacae*. — Die Stämme 7b und B 5 sind Raffinose nicht vergärende Varianten dieser Unterart. — Die Stämme V 31 und V 32 sind unbewegliche, harnsäurenegative und einen gelben Farbstoff erzeugende Varianten dieser Unterart und vermögen Saccharose und Raffinose nicht zu vergären. — Die Stämme G 12—7a sind citratpositive Intermediärformen, die durch das von ihnen unmittelbar nach ihrer Isolierung zumeist noch gezeigte negative Verhalten in der MR-Probe und durch ihre Fähigkeit, Acetoin zu bilden, eine besonders nahe *Aerobacter*-Verwandtschaft bekunden. Dabei sind sie wegen ihrer *cloacae*-spezifischen Gelatineverflüssigung und *cloacae*-gleichen Glycerinverwertung sowie auf Grund ihres zumeist positiven Harnsäuretestes bzw. ihrer überhaupt hohen N-Quellenaktivität und schließlich noch in Anbetracht ihrer Fähigkeit, H<sub>2</sub>S zu bilden, in die unmittelbare Verwandtschaftsnähe der H<sub>2</sub>S-positiven Unterart von *Aerob. cloacae* zu stellen. Der Stamm 4a ist eine unbewegliche Variante dieses Intermediär-Typs. Die Stämme D 9 und 7a sind als harnsäurenegative Varianten desselben zu werten, wobei D 9 einen gelben Farbstoff bildet, während 7a keine Pigmentbildung zeigt, aber weder Saccharose noch Raffinose vergärt.

### 3. Klassifizierung der Stämme in Tab. 2.

Die in Tab. 2 aufgeführten Stämme zeichnen sich durch ihr Unvermögen, Gelatine zu verflüssigen, sowie durch ihre Unbeweglichkeit aus. Allen gemeinsam ist weiterhin eine besonders vielseitige Aktivität gegenüber C-Quellen sowie — abgesehen von R 19 — eine solche gegenüber den 3 untersuchten N-Quellen.

Unter ihnen sind verhältnismäßig recht häufig Schleimformen vertreten. Auf Endoagar zeigen sämtliche Stämme ein ganz ähnliches Verhalten wie die intermediären Typen der Gruppe B in Tab. 1, nur sind ihre Kolonien erhabener, üppiger und opaker und weisen meist einen regelmäßigen Rand und eine runde konvexe Form auf. Dadurch sehen sie trotz dem bei den meisten auftretenden Fuchsinglanz

Tabelle 2.

\* bei 25° C

Gruppe	Untergruppe	Gel. Verfl. Beweglichkeit	37° C Citrat V. P. M. R. Indol	Harnstoff Uracil Harnsäure	Mannit Glucose Lactose Saccharose Salicin Dulcitol Inositol Adonit Glycerin Cellobiose Raffinose Maltose Xylose $\alpha$ -Meth. Inulin	Lackm. Milch Coagul. Säure Lackm. Red.	Neutr. Red.	$H_2$ : CO <sub>2</sub>	Bulir 45° C Eijkm.) Gas od. pH Red.	H <sub>2</sub> S-Bildg.
C	a R 23	—	—	+	+	S <sub>12</sub>	R	1:1,4	—	—
	R 19	—	—	—	—	S <sub>7</sub>	R*	S	—	—
	2b	—	—	+	—	S <sub>4</sub>	R	1:1,2	—	—
	1b	—	—	+	—	S <sub>4</sub>	R	1:1,5	—	—
	D 8	—	—	+	—	S <sub>2</sub>	R	S	—	—
	A 4	—	—	+	—	S <sub>8</sub>	R	2:1	—	—
	R 20	—	—	+	—	S <sub>10</sub>	R	1,2:1	—	—
	J 13	—	—	+	—	S <sub>3</sub>	R	3:1	—	—
	J 15	—	—	+	—	S <sub>3</sub>	R	3:1	—	—
	19c	—	—	+	—	S <sub>6</sub>	R	S	—	—
D	a H 26	—	—	+	+	S <sub>2</sub>	R	1:1,4	R +	++
	7c	—	—	+	+	S <sub>2</sub>	R	3:1	—	++
	17a	—	—	+	+	S <sub>2</sub>	R	2:1	—	++
	A 2	—	—	+	+	S <sub>3</sub>	R	2,6:1	5,7 befr	++
	A 3	—	—	+	+	S <sub>4</sub>	R	2:1	5,8 befr	++
E	a 9a	—	—	+	+	S <sub>2</sub>	R	1:1,3	—	++
	5a	—	—	+	+	S <sub>2</sub>	R	1,5:1	5,8 befr	++
	5b	—	—	+	+	S <sub>2</sub>	R	1,5:1	5,7 befr	++
	5c	—	—	+	+	S <sub>3</sub>	R	1,5:1	5,8 befr	++
		—	—	+	+	S <sub>3</sub>	R	1,5:1	5,8 befr	++



*aerogenes*-ähnlich aus, vor allem, wenn sie später bei Zimmertemperatur gehalten werden; dabei verblaßt auch bei ihnen wieder sowohl der Fuchsinglanz, wie auch die dunklere Koloniefarbe mehr oder weniger stark.

Auch hier ist wieder nach den Imvic-Reaktionen geordnet. Allerdings wurden die Stämme R 23, H 26 und 9a nicht in eine Gruppe zusammengefaßt, trotz ihres gemeinsamen, *aerogenes*-typischen Verhaltens in der MR- und VP-Probe. Jedoch ist durch das in der Tabelle gewählte Aufteilungsschema die Beziehung dieser 3 Stämme zu den ihnen jeweils in der Tabelle beigeordneten Untergruppen besonders hervorgehoben.

Diese Zusammenhänge äußern sich darin, daß R 23, wie die übrigen Glieder der Gruppe C, kein  $H_2S$  bildet, wohl aber H 26, der dadurch eine entsprechende Beziehung zu den übrigen Formen der Gruppe D verrät. Der Stamm 9a, ebenfalls  $H_2S$ -positiv, unterscheidet sich durch seine positive Indolreaktion von H 26 und nähert sich hierdurch den übrigen Stämmen der Gruppe E. Andererseits bilden diese 3 Stämme auf Grund ihres gleichartigen *aerogenes*-typischen Verhaltens in der MR- und VP-Probe unter sich zweifellos auch wieder eine Einheit. Dies äußert sich überdies in den Werten ihrer  $H_2:CO_2$ -Quotienten, die bei ihnen kleiner als 1 sind.

Die in den jeweiligen Untergruppen b untergebrachten Stämme der Tab. 2 stellen, und zwar in ihrer Gesamtheit, auf Grund ihres MR-positiven oder -variablen bzw. VP-positiven oder -variablen Charakters, ebenfalls eine Einheit dar. Auch in diesem Falle bekundet sich dies noch in dem ziemlich einheitlichen  $H_2:CO_2$ -Verhältnis, das aber — von wenigen Ausnahmen abgesehen — für diese Stämme größer als 1 ist. In späteren bei 30° C vorgenommenen Versuchen fielen die störenden Unregelmäßigkeiten übrigens weg, wie aus Tab. 2a (II. Mitteilung<sup>1</sup>) hervorgeht.

In bezug auf die 2 genannten Imvic-Teste und den  $H_2:CO_2$ -Quotienten weichen also diese in den Untergruppen b untergebrachten Formen von den ihnen jeweils zugeordneten Stämmen R 23, H 26 und 9a grundsätzlich ab: Sie sind als Intermediärstämme zu werten, die man aber, in Betracht ihres sonst mit R 23, H 26 oder 9a jeweils weitgehend übereinstimmenden Charakters, gruppenweise mit diesen in naher verwandtschaftlicher Beziehung stehend aufzufassen hat. Die ganzen Gruppen C, D und E mögen also demnach gewissermaßen als gleichwertig nebeneinander bestehende Entwicklungseinheiten zu deuten sein, wobei die Gruppe D das  $H_2S$ -positive Abbild von C, die Gruppe E das indolpositive Abbild von D darstellt.

Einige besondere Unregelmäßigkeiten, die in den beiden Gruppen C und D der Tabelle auftreten, müssen noch kurz erläutert werden.

Der Stamm R 19 besitzt nicht nur das niederste Gärtemperaturoptimum in seiner Gruppe, wonach er am meisten „Kaltstamm“-Charakter aufweist, sondern fällt auch hinsichtlich seiner Nichtverwertung von Uracil und Harnstoff als alleinigen N-Quellen am weitesten aus seiner Gruppe heraus. Er ist wohl am ehesten als eine typisch an niedere Temperaturen angepaßte und enzymatisch teilweise reduzierte Variante dieser Gruppe aufzufassen, deren Vertreter sich übrigens mehr oder weniger alle durch ein etwas unterhalb 37° C liegendes Temperaturoptimum, hinsichtlich Vermehrungs- und Gärungsvermögen, auszeichnen, ähnlich wie die Intermediärstämme in Tab. 1.

<sup>1</sup> Siehe die folgende Mitteilung (S. 132).

Der Stamm 19c stimmt durch seine konstant negative VP-Reaktion nicht mit den übrigen Vertretern seiner Untergruppe überein, jedoch weisen die sonstigen Ergebnisse seiner Tests eine solche Gleichwertigkeit mit dem Untergruppentyp auf, daß an seiner Zugehörigkeit zu dieser kaum zu zweifeln ist. Der Gedanke liegt nahe, daß es sich hier um einen Stamm handelt, der innerhalb dieser fluktuierenden „Entwicklungszone“, welche diese Untergruppe darstellen mag, sich auf einer steteren Entwicklungsstufe befindet.

Bemerkenswert ist ferner noch, daß H 26 eine für *Aerob. aerogenes* nicht charakteristische EIJKMAN-Probe (45° C) liefert, wie dies aber als gelegentliche Ausnahme bei solchen Formen auch schon von anderer Seite beobachtet werden konnte.

Die Einordnung der in Tab. 2 enthaltenen Stämme in das BERGEYSche System ergibt folgendes Bild:

Stamm R 23 ist auf Grund seiner IRK — — + +, seiner positiven Harnsäure- und negativen H<sub>2</sub>S-Probe sowie seines H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>-Verhältnisses, das kleiner als 1 ist, zweifellos als *Aerob. aerogenes* zu identifizieren.

Für H 26 und 9a läge ohne weitere Einschränkung die gleiche Möglichkeit vor, wenn sie nicht H<sub>2</sub>S bilden würden, denn nach BERGEY bildet *Aerob. aerogenes*, gleich wie *Aerob. cloacae*, kein H<sub>2</sub>S. Diese beiden Stämme müssen also infolge des positiven Ausfallens ihrer H<sub>2</sub>S-Probe als indol-negative bzw. indolpositive Varianten einer H<sub>2</sub>S-bildenden — im übrigen auch dulcitpositiven — Unterart von *Aerob. aerogenes* gewertet werden.

Die Intermediärformen R 19—19c entsprächen nach BERGEY durch ihre Unfähigkeit zur H<sub>2</sub>S-Bildung am ehesten *Esch. intermedium*, die im Gegensatz zu *Esch. freundii* kein H<sub>2</sub>S bildet und keine gelatineverflüssigenden Formen umfaßt. Andererseits ist bei *Esch. intermedium* nach den Angaben BERGEYS nie die Bildung von Acetoin beobachtet worden. Mit diesem Verhalten steht diese Art *Esch. coli* näher, als die hier vorliegenden Stämme, die nicht nur Acetoin bilden, sondern auch sehr N-Quellenaktiv sind. Zwar ist bei BERGEY das Verhalten gegenüber Harnsäure als alleinige N-Quelle, die als Kriterium in diesem Falle besonders in Betracht käme, für *Esch. intermedium* nicht erwähnt, jedoch haben WERK, MANN und GILLEN (l. c.) für *Citrob. intermedium* und *Citrob. glycologenes*, die von BERGEY als syn. mit *Esch. intermedium* bezeichnet werden, das Fehlen der Harnsäure-Verwertung festgestellt. Zudem sind die von diesen Autoren untersuchten Formen beide beweglich, wohingegen bei keinem der hier in Frage stehenden Stämme Beweglichkeit festgestellt werden konnte. Alle diese Faktoren stellen *Esch. intermedium* viel näher zu *Esch. coli* als zu *Aerob. aerogenes*. Die hier in Rede stehenden Stämme jedoch gleichen viel mehr der letztgenannten Art. Aus diesem Grunde erscheint für sie eine Zuordnung zu *Esch. intermedium* nicht folgerichtig.

Bei den intermediären Stämmen 7c—A 3 und 5a—6a könnte an eine Identifizierung mit *Esch. freundii* gedacht werden, da sie ebenfalls H<sub>2</sub>S in Pepton-Eisen-Agar bilden. Die Gründe aber, welche bereits bei der Besprechung der Tab. 1 eine Zuteilung der dort aufgeführten *cloacae*-



ähnlichen Zwischenformen zu *Esch. freundii* als nicht zulässig erscheinen ließen, gelten sinngemäß auch für die  $H_2S$ -positiven Intermediärformen der Tab. 2. Auch sie würden durch eine Zuordnung zu *Esch. freundii* irreführenderweise ebenfalls durch eine viel nähere Verwandtschaft zu *Esch. coli* als durch eine solche zu *Aerob. aerogenes* gekennzeichnet sein.

Eine Einreihung dieser  $H_2S$ -positiven Intermediärformen in die Gattung *Erwinia* kommt aus den gleichen Gründen, wie sie bei der Besprechung der Stämme in Tab. 1 dargelegt wurden, nicht in Frage, wenngleich wir bei der Durchsicht dieser Gattung bezeichnenderweise wiederum eine  $H_2S$ -bildende Art, *Erw. mimipressuralis*, finden, welche den  $H_2S$ -positiven Intermediär-Stämmen in Tab. 2 weitgehend gleicht.

Schließlich könnte auch noch die Gattung *Klebsiella* für die Aufnahme der hier vorliegenden, sowohl  $H_2S$ -negativen wie  $H_2S$ -positiven Intermediärtypen — wenigstens, soweit sie Schleimformen sind — in Betracht gezogen werden. Die  $H_2S$ -Bildung ist nämlich in dieser Gattung als Merkmal unberücksichtigt geblieben. Die übrige Gattungsbeschreibung aber würde so ausgezeichnet zu den Eigenschaften mehrerer dieser Stämme passen, daß deren Zuordnung zu *Klebsiella* ohne weiteres gegeben schiene. Nun müssen allerdings doch erhebliche Bedenken aufsteigen, eine so beträchtliche Anzahl von Stämmen, deren Fundort jedenfalls in gar keiner Weise für eine eventuelle Pathogenität spricht, in eine Gattung einzuordnen, die gerade auf dem Grundsatz der Pathogenität aufgestellt wurde. Und was das weitere Merkmal dieser Gattung, die Kapselbildung, anbelangt, so weist BERGEY selbst auf die Unzulänglichkeit dieses Merkmals als Bestimmungsfaktor hin, indem er bemerkt, daß letzten Endes alle Glieder der *Coli-Aerogenes*-Gruppe nicht nur in der S(smooth)- und R(rough)-Form vorkommen können, sondern auch in der M(mucoid)-Form, wobei sie dann ebenfalls Kapselbildung zeigen. Im übrigen machte sich auch während der ganzen Arbeiten mit den hier untersuchten Stämmen nie eine pathogene Wirkung derselben bemerkbar.

Danach scheint eine Zuordnung der in Tab. 2 aufgenommenen Intermediärformen zu keiner der zwei oben erwähnten Arten *Esch. intermedium* oder *Esch. freundii* angeraten und noch weniger kommt für sie eine solche zu den Gattungen *Erwinia* oder *Klebsiella* in Frage, weshalb hier lediglich eine formelle Definition ihrer Stellung innerhalb der *Coli-Aerogenes*-Sektion gegeben werden soll:

Die Stämme 2b—19c sind  $H_2S$ -negative, zum Teil in mucoider Form vorliegende, *aerogenes*-ähnliche Intermediärformen, die Harnstoff, Uracil und Harnsäure als alleinige N-Quellen verwerten und eine besonders vielseitige fermentative Wirkung gegenüber C-Quellen zeigen, welche sie unterhalb 37° C zum Teil charakteristischer (stärkere Gasbildung) als bei dieser Temperatur vergären. — Stamm R 19 ist eine von diesen Formen ableitbare, in bezug auf die N-Quellen-Aktivität und Citratverwertung reduzierte Variante. Er verwertet zwar Harnsäure, nicht aber Uracil und Harnstoff als alleinige N-Quellen und ist citrat-variabel. Sein Temperaturoptimum für Vermehrung und Gärung liegt besonders tief, etwa zwischen 25° und 30° C. — Die Stämme 7c—A3 und 5a—6a sind den Stämmen 2b—19c analoge, aber  $H_2S$ -positive Formen und hinsichtlich ihrer C-Quellen-Aktivität weniger empfindlich gegen Temperaturen um

37° C. Sie scheiden sich in indolnegative (7c—A 3) und indolpositive (5a—6a) Varianten. — Die Charakterisierung der *Aerob. aerogenes*-Formen R 23, H 26 und 9a wurde bereits schon auf Seite 110 vorgenommen.

#### 4. Klassifizierung der Stämme in Tab. 3.

Tab. 3 vereinigt alle Stämme, die Harnsäure und meist auch Uracil als alleinige N-Quellen nicht verwerten, aber eine positive Citratprobe aufweisen; außerdem verhalten sie sich gegenüber Gelatine inaktiv. Ihr  $H_2:CO_2$ -Verhältnis ist ziemlich übereinstimmend so, daß der Wasserstoff überwiegt; nur D 10 bildet mehr  $CO_2$  als  $H_2$ . Die ELJKMANSche Probe bei 45° C ist bei fast allen Stämmen vollkommen negativ; nur K 16, K 17 und H 30 sind unter diesen Bedingungen immerhin noch zu einer mittelmäßigen Vermehrung mit entsprechender Säuerung des Mediums fähig, zur Gasbildung und zur Reduktion des Neutralrot-Farbstoffes jedoch nicht.

Auf Endoagar wachsen die Stämme gewöhnlich lilarot bis dunkelrot gefärbt, zeigen mäßigen bis guten Fuchsinglanz und verblassen bei Zimmertemperatur meistens nicht oder nur langsam.

Die Stämme 10a und D 10 sind durch ihre Imvic-Teste zweifellos als *Aerobacter*-Formen gekennzeichnet. Ihr  $H_2S$ -Bildungsvermögen würde als Unterart-Merkmal zu werten sein. Das Fehlen der Gelatineverflüssigung spräche für ihre Zuordnung zu *Aerob. aerogenes*, die Beweglichkeit dagegen für eine solche zu *Aerob. cloacae*, für die auch die Art ihrer Glycerin-Verwertung so typisch ist, daß man — in Übereinstimmung übrigens mit diesbezüglichen Befunden anderer Autoren (s. BERGEY l. c.) — diese Stämme als dieser Art ähnliche Typen deuten kann; die Fähigkeit, Gelatine zu verflüssigen, könnten sie „wieder“ verloren haben oder „noch nicht“ besitzen. Damit wäre für sie in gewissem Sinne ein „noch“ schwach intermediärer Charakter aufgezeigt, was auch mit ihrem Unvermögen, Harnsäure zu verwerten, in Einklang zu bringen wäre.

Stamm 8a gleicht in vielen Eigenschaften, insbesondere aber was N-Quellen- und Glycerin-Verwertung anbelangen, so sehr den Stämmen 10a und D 10, daß er in Anbetracht seiner variablen MR-Reaktion als eine ihnen nächstverwandte Intermediärform zu betrachten ist. Eine Zuordnung zu der Intermediärform *Esch. freundii* aber ist außer wegen seines VP-positiven Verhaltens auch deshalb nicht zulässig, weil er im Gegensatz zu dieser Art Uracil verwertet (MITCH. u. LEV. 1938) und eine *cloacae*-spezifische Glycerinvergärung zeigt (vgl. unt. BERGEY, usw.).

Solche Hinderungsgründe für eine Beiordnung zu *Esch. freundii* sind für die Stämme 19a und 19b nur durch ihr Verhalten in der VP-Probe gegeben. Daher mögen sie, trotz ihrer Fähigkeit, Acetoin zu bilden, dieser



Tabelle 3.

Gruppe	Stämme	Beweglichkeit	Gel. Verfl.	37°C				Harnsäure	Uracil	Harnstoff	Mannit	Glucose	Lactose	Saccharose	Salicin	Dulcitol	Inosit	Adonitol	Glycerin	Cellobiose	Raffinose	Maltose	Xylose	α-Meth.	Inulin	Lackm. Milch	Neutr. Red.	H <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub>	Bulir 45° C (Eijkm.)			H <sub>2</sub> S-Bildg.
				Indol	M.R.	V.P.	Citrat																						Red.	Gas od. pH	Wachstum	
F	10a	+	—	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	[S]	+	+	+	+	+	—	R	2:1	—	—	—	+	
	D 10	+	—	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	[S]	+	+	+	+	+	—	R	1:1,4	—	—	—	+	
G	8a	+	—	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	[S]	+	+	+	+	+	—	R	1:1	—	—	—	+	
	19a	+	—	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	R	3:1	—	—	—	+	
H	19b	+	—	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	R	2:1	—	—	—	+	
	K 17	+	—	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	S(+)	—	+	+	+	—	R	4,2:1	(—) 5,7	befr	—	+	
J	K 16	+	—	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	S(+)	—	+	+	+	—	R	4,7:1	(—) 5,8	befr	—	+	
	1a	—	—	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	R)	3:1	—	—	—	+	
K	3b	—	—	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	R)	3:1	—	—	—	+	
	3c	—	—	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	R)	2,5:1	—	—	—	+	
	U 35	—	—	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	R)	S	—	—	—	+	
	R 21	+	—	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	[S]	+	+	+	+	+	—	R)	7:1	—	6,5	ger	+	
K	R 25	+	—	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	[S]	+	+	+	+	+	—	R)	5:1	—	6,6	ger	+	
	R 18	+	—	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	—	R)	5:1	—	6,5	ger	+	
	H 30	+	—	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	[S]	—	—	+	+	—	R	4,8:1	—	5,8	maß	+		

Art beigeordnet werden, jedoch mit der Einschränkung, daß sie als VP-positive Varianten dieser Art zu gelten haben und damit der Gattung *Aerobacter* näher stehen als der Art *Esch. coli*, was mit der Benennung „*Escherichia*“ allerdings nicht in Einklang zu bringen ist.

Alle restlichen Stämme der Tab. 3 bilden kein Acetylmethylcarbinol und zeigen auch in ihren sonstigen Eigenschaften mit *Esch. freundii* eine so weitgehende Übereinstimmung, daß ihrer Identifizierung mit dieser Art im wesentlichen nichts entgegensteht.

Allerdings geben BERGEY sowohl, als auch WERKMAN and GILLEN (1932), sowie VAUGHN and LEVINE (1942) für *Esch. freundii* normale Glycerinvergärung an. Letztere Autoren z. B. fanden von 196  $H_2S$ -bildenden Intermediärstämmen (*Esch. freundii* bei BERGEY) 99,5% mit positiver Glycerinvergärung. Meine Stämme in Gruppe K — ebenfalls  $H_2S$ -bildend — zeigen aber ein Verhalten, das hiervon abweicht und sich besser in die Art der Glycerinverwertung einfügt, die *Aerob. cloacae* bzw. die Stämme in Gruppe F dieser Tabelle aufweisen. Demzufolge darf nicht übersehen werden, daß sie, obwohl sie sonst als indolpositive Intermediärformen vom Typus *Esch. freundii* aufzufassen sind, andererseits durch ihre *cloacae*-typische Glycerinverwertung mit *Aerob. cloacae* in gewisser verwandtschaftlicher Beziehung stehen. Auch für die Stämme 1a—U 35 in Gruppe J der Tabelle ergibt sich noch eine Differenz hinsichtlich ihrer Identifizierung mit *Esch. freundii*. BERGEY stellt zu dieser  $H_2S$ -bildenden Art zwar außer beweglichen auch unbewegliche Formen, VAUGHN and LEVINE (l. c.) aber fanden unter ihren 196 Intermediär-Stämmen mit  $H_2S$ -Bildung nur bewegliche. Die Formen in Gruppe J sind alle unbeweglich. Dies mag bei ihrer Zuordnung zu *Esch. freundii* immerhin berücksichtigt werden.

Zusammenfassend sollen die hier besprochenen Stämme folgendermaßen charakterisiert werden: Bei den Stämmen 10a und D 10 handelt es sich meines Erachtens trotz fehlender Gelatineverflüssigung um Vertreter einer  $H_2S$ -positiven, Gelatine nicht verflüssigenden Unterart von *Aerob. cloacae*. Ihr Unvermögen zur Gelatineverflüssigung und Harnsäureverwertung und ihre eingeschränkte Aktivität gegenüber Uracil kann in gewissem Sinne als leicht intermediärer Einschlag gewertet werden, zumal auch die Endo-Kolonien dieser Stämme intermediären Charakter aufweisen. Der Stamm 8a ist eine dieser Unterart nahverwandte Intermediärform im üblichen Sinne dieser Benennung. — Die Stämme 19a und 19b, K 16 und K 17 sowie 1a—U35 können mit *Esch. freundii* identifiziert werden. Erstere stellen eine bewegliche, mehr *Aerobacter*-verwandte, VP-positive Variante derselben dar, die beiden nächsten einen beweglichen, mehr *Esch. coli*-verwandten, VP-negativen Typus und die letzten vier (1a—U 35) sind unbewegliche *Esch. freundii*-Typen mit mehr *Esch. coli*-Verwandtschaft. — In der letzten Tabellengruppe K (R 21—H 30) sind bewegliche, indolpositive *Esch. freundii*-Formen vereinigt, deren *cloacae*-ähnliche Glycerinverwertung (vgl. 10a—8a) sie in gewisse verwandtschaftliche Beziehungen zu *Aerob. cloacae* setzt. Im übrigen aber sind sie als mehr *Esch. coli*-verwandt zu betrachten.



### 5. Klassifizierung der Stämme in Tab. 4.

Tab. 4 vereinigt alle Stämme, die nicht die Fähigkeit besitzen, Citrat als alleinige C-Quelle zu verwerten, und die, mit Ausnahme von 6b, eine negative VP- sowie eine positive MR-Reaktion aufweisen.

Die Stämme A 1—Fx können auf Grund ihrer Fähigkeit, Lactose unter Gas- und Säurebildung zu vergären, und auf Grund ihrer Unfähigkeit, aus Pepton-Eisen-Agar  $H_2S$  zu bilden, wodurch sie im Verein mit den bereits genannten Eigenschaften als *Esch. coli* ähnlich charakteristisch sind, von den Stämmen T 33—4b abgegrenzt werden. — Die zuletzt genannten Stämme zeigen selbst nach Gewöhnung keine sichtbare Lactose-Vergärung, dagegen vermögen sie aus Pepton-Eisen-Agar, wenn auch in mäßigeren Mengen,  $H_2S$  zu bilden. — Schließlich bleiben noch die beiden Stämme 6b und 12a übrig. Diese lassen sich wegen ihrer positiven Lactosevergärung in die 2. Tabellengruppe M nicht einfügen. Von der 1. Gruppe L aber unterscheiden sie sich durch einige andere Eigenschaften, worin sie sich atypisch zu *Esch. coli* verhalten. Der Stamm 6b z. B. zeigt u. a. eine positive VP-Reaktion und bildet in Pepton-Eisen-Agar Schwefelwasserstoff, 12a verwertet Harnsäure als alleinige N-Quelle und weist eine unter 30° C liegende Optimaltemperatur auf.

Nach dieser Übersicht ergibt die weitere Klassifizierung folgendes Bild:

Außer den bereits aufgezeigten, mit *Esch. coli* übereinstimmenden Eigenschaften, besitzen die Stämme der Gruppe L — mit gewisser Einschränkung für Stamm Fx — u. a. auch in ihrer Beweglichkeit, in ihrem Indolbildungsvermögen und in dem negativen Ausfall ihrer Harnsäureprobe für *Esch. coli* charakteristische Merkmale. Auch ihre Endo-Kolonien sind *coli*-ähnlich.

Die ersten beiden Stämme, A 1 und L 7, zeigen jedoch mit ihrer Fähigkeit zur Harnstoff-, aber Unfähigkeit zur Uracil-Verwertung auch einige für *Esch. coli* atypische Eigenschaften. Gerade das umgekehrte Verhalten ist nämlich für diese Art charakteristisch. Auch dürften diese beiden Stämme, um mit *Esch. coli* eindeutig identifiziert werden zu können, weder Cellobiose noch  $\alpha$ -Methylglucosid vergären, müßten außerdem Neutralrot reduzieren und eine positive ELJMAN-Probe bei 45° C geben.

Wenn nun auch vereinzelte Abweichungen vom *Esch. coli*-Typus nicht gleich die Möglichkeit solcher Zuordnung völlig ausschließen, so wird ein so gehäuftes Abweichen von der Norm zu der Folgerung führen müssen, daß es sich bei den Stämmen A 1 und L 7 nicht um normale *Esch. coli*-Formen vom fäkalen Warmblütertyp handelt, sondern — vor allem auch dem negativen Ausfall ihrer ELJMAN-Probe entsprechend — wahrscheinlich um Kaltblütertypen. Sollten sie aber doch einer Warmblüter-Fäkalverunreinigung entstammen, so müßte diese — bei den atypisch veränderten Eigenschaften der fraglichen Stämme — zumindest zeitlich weiter zurückliegen und würde daher hygienisch als nicht mehr so bedenklich zu werten sein.

Bei den Stämmen H 28—Fx sind dagegen die Forderungen für eine Zuordnung zum Warmblüter-*Coli*-Typ weitestgehend erfüllt.

Zwar sind auch hier noch kleinere, aber höchstens als Variantenmerkmale zu wertende Unregelmäßigkeiten vorhanden, wie der positive Ausfall der Cellobiose-Gärprobe bei H 28 nach entsprechender „Gewöhnung“, die mangelnde Uracilverwertung bei Fy—Fx, sowie das Fehlen der Indolbildung und Beweglichkeit bei Fx.

Tabelle 4.

\* bei 25°C

Gruppe	Stämme	Gel. Verfl. Beweglichkeit	37°C Citrat V.P. M.R. Indol	Harnstoff Uracil Harnsäure	Mannit Glucose Lactose Sacharose Salicin Dulcitol Inositol Adonitol Glycerin Cellobiose Raffinose Maltose Xylose $\alpha$ -Meth. Inulin	Lackm. Milch	Neutr. Red.	$H_2$ : CO <sub>2</sub>	Bulir 45°C (Eijkm.) Wachstum Gas od. p <sub>H</sub> Red.	H <sub>2</sub> S-Bildg.
L	A 1	+	+	+	+	S <sup>co</sup> <sub>3</sub>	(R)	S	—	—
	L 7	+	+	+	+	S <sup>co</sup> <sub>3</sub>	(R)	S	—	—
	H 28	+	+	—	—	S <sup>co</sup> <sub>3</sub>	R	2:1	R	—
	Fy	+	+	—	—	S <sup>co</sup> <sub>3</sub>	R	2:1	R	—
M	2a	+	+	—	—	S <sup>co</sup> <sub>3</sub>	R	1,7:1	R	—
	Fx	—	—	—	—	S <sup>co</sup> <sub>16</sub>	(R)	3:1	(—)	5,2 sgt
	T 33	+	+	—	—	—	R	S	—	+
	T 34	—	+	—	—	—	R	2,3:1	—	+
N	4b	—	+	—	—	—	R	2:1	—	+
	6b	+	+	—	—	S <sup>co</sup> <sub>7</sub>	R	1,2:1	—	+
	12a	+	+	—	—	S—(R)	R*	S	—	—



Im übrigen aber sind diese Stämme als Warmblüter-*Coli*-Typen anzusprechen, insbesondere auch wegen ihres positiven Verhaltens in der ELJMKAN-Probe bei 45° C. Zwar weicht auch hier wiederum der Stamm Fx von dem klassischen Verhalten etwas ab, indem er bei dieser Probe — entsprechend seiner schon bei 37° C geringeren Reduktionskraft — nur eine schwache Reduktion von Neutralrot und keine Gasbildung mehr hervorruft, doch zeigt er dabei immerhin noch sehr gutes Wachstum und ziemlich kräftige Säurebildung. Die Eigenart dieses Stammes, C-Quellen, speziell auch Glucose, bei 37° C zuweilen sogar nur mit Säure- oder wenigstens nur mit verminderter Gasbildung zu vergären, mag ebenfalls noch hervorgehoben werden. Diese Eigenschaften in Verbindung mit seiner Unbeweglichkeit und im übrigen auch mit seiner Schleimbildungsfähigkeit bei 37° C mögen diesen Stamm bereits der *Shigella*-Gruppe etwas zugewandt erscheinen lassen.

Die in der nächsten Gruppe M aufgeführten Stämme R 33—4b würden auf Grund ihrer Imvic-Teste als indolnegative *Esch. coli*-Typen anzusprechen sein. Jedoch steht der bei diesen Formen festgestellte „negative“ Ausfall der Lactose-Vergärung hiermit nicht im Einklang.

Die Gärprobe in Lactose-Brühe verläuft nämlich bei diesen Stämmen so, daß auch nach längerer „Gewöhnung“ an dieses Medium keine augenscheinlich zu erkennende Vergärung von Lactose, weder bei 37° C noch bei 25° C, zu erzielen ist. Zwar treten dabei bisweilen geringe Spuren von Gas auf, das Medium bleibt aber alkalisch. Allerdings erreicht dasselbe häufig nicht ganz den hohen pH-Wert, wie er normalerweise bei völlig negativ verlaufenden Gärproben auftritt. Die Vermehrung ist dabei aber sehr kräftig. Es hat also fast den Anschein, als ob eine sehr langsam verlaufende und geringfügige Säurebildung aus Lactose durch die alkalisch reagierenden Stoffwechselprodukte des Stickstoff-Verwendungs-Stoffwechsels so neutralisiert wird, daß sie nicht wahrzunehmen ist. Im Zusammenhang mit dieser „negativen“ oder „dauernd verzögerten“ Lactose-Verwertung steht auch das bei diesen Stämmen beobachtete Verhalten in Lackmusmilch, welche, abgesehen von einer geringen Alkalinisierung, während der Dauer von 21 Tagen keine Veränderung erfährt. — Auf dem lactosehaltigen Endo-Agar wachsen diese Stämme — wie überhaupt bei 37° C — ziemlich langsam und bilden sehr kleine, blaßrosafarbige Kolonien, die bei längerer Kultur häufig einen hell-karminrot leuchtenden, zentralen Kern erhalten. Fuchsinglanz tritt nie auf. Die ELJMKANSche-Probe (BULIR 45° C) verläuft für sie negativ, was auch mit ihrer tieferen Wachstums-Optimaltemperatur (etwa 30° C) im Einklang steht. Im übrigen erweisen sich diese Stämme sonst als ziemlich *coli*-ähnlich.

Solche *coli*-ähnliche Formen mit „negativer oder dauernd verzögerter“ Lactose-Verwertung werden nun bekanntlich als sogenannte *Paracoli*-Bakterien bezeichnet, die sich mit dieser Eigenschaft der gewöhnlich lactosenegativen *Salmonella*-Gruppe nähern und daher als Bindeglied zwischen dieser und der lactosepositiven *Coli-Aerogenes*-Gruppe gelten. T 33—4b sind also zu dieser Gruppe gehörende Formen.

Den Charakter als Übergangsformen bekunden die hier untersuchten Stämme T33—4b auch noch durch ihr fermentatives Verhalten gegenüber zwei anderen C-Quellen. Bei ihrer Kultur in Saccharose-Bouillon kann nämlich ganz ähnliches beobachtet werden wie bei ihrer Kultur in Lactosebrühe. Es scheint also auch dieser Zucker schwach angegriffen zu werden. In vollkommenerem Maße ist dies bei Cellobiose der Fall, denn nach genügend langer Gewöhnung an diesen Zucker, vergären sie denselben in normaler Weise. Man könnte aus diesen Erscheinungen auf

das Vorhandensein einer sich auf solche Substanzen beziehenden labilen Fähigkeit zur Fermentbildung schließen, die sich möglicherweise bei diesen Formen, je nach der Richtung ihrer Weiterentwicklung, sowohl positiv wie negativ potenzieren kann.

Nach der Arten-Gliederung des Genus *Paracolobactrum* von BORMAN, STUART und WHEELER (1944) — bei BERGEY als Anhang I zum Tribus *Eschericheae* wiedergegeben — würden diese Stämme *P. coliforme* zuzuordnen sein, wenn wir nur die bei 37° C gewonnenen Imvic-Ergebnisse berücksichtigen wollten. In späteren Versuchen bei 25° C (Tab. 4a, folgende Arbeit) erwiesen sie sich aber alle als citrat-positiv und, mit Ausnahme von T 33, sogar als VP-positiv. Demgemäß sind also T 34 und 4b zu *P. aerogenoides*, T 33 zu *P. intermedium* zu stellen.

Stamm 6b besitzt im Gegensatz zu diesen *Paracoli*-Stämmen eine positive Lactose-Vergärung und hätte daher eigentlich mit ihnen nichts zu tun. Auffallenderweise ist er aber in seinem übrigen Verhalten, insbesondere in der Tendenz zur Saccharose- und Cellobiose-Verwertung, den vorausgehenden Stämmen sehr ähnlich, nur daß bei ihm die Neigung hierzu noch etwas stärker ausgeprägt ist und in dem schwachen Angriff auf Raffinose eine Erweiterung findet. Auch die Optimumtemperatur für seine Vermehrung und für die Gärung liegt deutlich unterhalb 37° C. Die Eigenschaften auf Endoagar und in Lackmusmilch sind natürlich, seiner positiven Lactose-Vergärung entsprechend, anders. Lackmusmilch wird gesäuert und koaguliert, und auf Endoagar erhalten die roten Kolonien Fuchsinglanz, der aber bei Zimmertemperatur ziemlich schnell wieder schwindet. Mit seiner Eigenschaft, Acetoin bilden zu können, und in Anbetracht der aufgezeigten Ähnlichkeiten des Stammes mit den vorausgehenden *Paracoli*-Formen ist dieser lactosepositive Stamm als Intermediärtyp zwischen *Paracolobactrum* und *Aerobacter* aufzufassen, der jedoch Citrat als alleinige C-Quelle irregulärerweise nicht verwertet.

Stamm 12a fermentiert bei 37° C C-Quellen häufig nur unter Säurebildung. Bei 25° C zeigt er aber vollkommen normale Gäreigenschaften und bildet neben Säure auch immer ziemlich beträchtliche Mengen Gas. Er ist also ein typischer „Kaltgärstamm“, ähnlich bzw. noch ausgeprägter wie der Stamm R 19 in Tab. 2.

Während es nun verhältnismäßig leicht war, Stamm R 19 als eine *Aerob. aerogenes* nahestehende Intermediärform zu erkennen, ist die Stellung des Stammes 12a bei *Esch. coli*, welche man auf Grund seiner positiven MR- sowie seiner negativen VP- und Citrat-Probe für ihn eigentlich annehmen müßte, gar nicht so eindeutig gegeben. Außer durch seinen Kaltstamm-Charakter erweist sich dieser Stamm nämlich auch dadurch *coli*-fremd, daß er Cellobiose vergärt, bei 37° Neutralrot nicht und bei 25° C erst nach 5 Tagen reduziert, keine Milchkoagulation hervorruft und sogar gegen Harnsäure als alleinige N-Quelle sich aktiv verhält. Schließlich weist er noch eine *cloacae*-ähnliche Glycerinverwertung auf und seine Endo-Kolonien zeigen keinen Fuchsinglanz, sondern sogar meist eine sehr helle, blaßrosa Färbung.

In Analogie zur vermuteten Entwicklungsweise von R 19 aus einer *Aerob. aerogenes*-Form bis zu einem dieser Art nahestehenden Intermediärtyp, unter der Annahme eines teilweisen Verlustes der Citratverwertung und Verminderung der



Acetoin-Bildungsfähigkeit bei gleichzeitiger Anpassung an tiefere Temperatur, könnte man für 12a, in Anbetracht seiner auffallenden, für *Aerob. cloacae* typischen Glycerinverwertung und seiner Beweglichkeit, eine ähnliche Entwicklung aus *Aerob. cloacae* bzw. aus einer zu dieser Art in Beziehung stehenden Zwischenform annehmen, nur wäre in diesem Falle die dem Stamm R 19 noch teilweise zukommende Fähigkeit, bei 37° C Acetoin zu bilden, bei 12a bereits ganz verloren gegangen. Auf diese Weise könnte man sich, bei gleichzeitiger Einbuße des Gelatineverflüssigungsvermögens seine Entwicklung bis zur *Esch. coli*-Stufe denken, wobei aber die Verwertbarkeit von Harnsäure und die für *Aerob. cloacae* typische Art der Glycerinverwertung gleichsam als intermediäres Relikt bei ihm erhalten geblieben wäre. Seine „noch“ intermediäre Natur konnte überdies durch spätere Versuche noch beweiskräftiger nachgewiesen werden, denn bei 25° C Kulturtemperatur ist dieser Stamm auch in der Lage, wenngleich nur in sehr mäßigen Mengen, Acetoin zu bilden (Tab. 4a, folg. Arb.).

Ein Stamm mit solchen Eigenschaften kann nun jedenfalls nicht als Warmblüter-*Coli* identifiziert werden, sondern mag als schwach intermediären Charakter tragender coliformer Typ aufgefaßt werden, der in Anbetracht seiner Kalt-Gäreigenschaften einen Kaltblütertyp darstellt.

Eine Zusammenfassung der hier erfolgten Besprechung der Stämme in Tab. 4 ergibt nun folgende Charakterisierung: A 1 und L 7 sind bewegliche, indolpositive *Esch. coli*-Stämme mit für Warmblüter-*Coli* zum Teil atypischen Eigenschaften. Beide verwerten Uracil als alleinige N-Quelle nicht, dafür aber irregulärerweise Harnstoff. Ihre Aktivität gegenüber C-Quellen ist verhältnismäßig vielseitig, auch Cellobiose und  $\alpha$ -Methylglucosid wird angegriffen. Die für sie negativ verlaufende EIJKMAN-Probe (45° C) läßt auf ihre Herkunft vom Kaltblüterdarm schließen — Die Stämme H 28, Fy<sup>1</sup> und 2a sowie der Stamm Fx<sup>1</sup> sind *Esch. coli*-Formen mit durchweg ziemlich typischem Verhalten für Warmblüter-*Coli*. H 28, Fy und 2a sind indolpositive, bewegliche Stämme, von denen H 28 — allerdings erst nach längerer Bebrütung — irregulärerweise auch Cellobiose vergärt. Fy und 2a dagegen zeigen durch ihr Unvermögen, Uracil als alleinige N-Quelle zu verwerten, eine geringe Abweichung vom Normaltyp. Das gleiche ist bei dem indolnegativen, unbeweglichen Stamm Fx der Fall, der eine schleimbildende Form ist, und durch seine geringere Gasbildung und das gelegentliche Vorkommen der „Nursäurebildung“ in Gär-Medien gewisse Beziehungen zur *Shigella*-Gruppe aufweist. — Die Stämme T 33, T 34, 4b gehören der Gattung *Paracolobactrum* an. Bei 37° C kultiviert, weisen sie Invic-Reaktionen auf, wie sie für den indolnegativen Typus von *Esch. coli* charakteristisch sind, wonach sie *P. coli* zuzurechnen wären. Auf Grund späterer Versuchsergebnisse (folgende Mitteilung), wonach sie bei 25° C sowohl Citrat verwerten, als auch — mit Ausnahme von T 33 — Acetoin bilden, sind sie jedoch *P. aerogenoides* (T 34 und 4b) bzw. *intermedium* (T 33)

<sup>1</sup> Fy und Fx sind nicht aus Bier sondern aus menschlichen Faeces zu Vergleichszwecken isolierte Stämme.

zuzuordnen. T33 ist beweglich, T34 und 4b sind unbewegliche Formen. — Stamm 6b ist als bewegliche, citrat-negative Intermediärform zwischen *Aerobacter* und *Paracolobactrum* charakterisiert, die trotz ihrer positiven Lactosevergärung der zweitgenannten Gattung als ziemlich nahestehend erachtet wird. — Stamm 12a ist als beweglicher, indolnegativer *coli*-former Typ zu definieren, der mit seinem tiefen Temperaturoptimum für Vermehrung und Gärung vom Typus des Warmblüter-*Coli* stark abweicht. Aus diesem Grunde, in Verbindung u. a. mit seiner in späteren Versuchen bei 25° C gezeigten geringen Fähigkeit zur Acetoinbildung, wird er als „noch“ schwach intermediären Charakter tragender Kaltblütertyp gedeutet, der in seiner Entwicklung, von einer mit *Aerob. cloacae* verwandten Zwischenform abgezweigt, die *coli*-gleiche IRK-Stufe nahezu, aber noch nicht vollkommen erreicht hat.

### C. Zahlenmäßige Zusammenstellung der gefundenen Formtypen und deren sanitäre Bedeutung.

Wenngleich von einigen Autoren, wie z. B. von PARR (1938), auch schon Bedenken dagegen erhoben wurden, wenn den citratpositiven Intermediärformen keinerlei sanitäre Bedeutung beigemessen wird, so hat sich doch die u. a. von MINKEWITSCH (1930, 1936) vertretene Ansicht bisher am meisten Geltung verschafft, welche besagt, daß nur *Esch. coli* und ihre Varietäten, sowie die Lactose nicht vergärenden *Paracoli*-Bakterien und *Bact. coli mutabile*, sanitäre Bedeutung besitzen, da nur diese als obligat oder häufiger vorkommende Darmbewohner von Warmblütern anzusehen sind. Als typische Merkmale geben diese Formen außer der positiven MR- und negativen VP-Reaktion eine negative Citrat-Probe und eine positive EIJMKAN-Probe. Letztere fällt nur für wenige Warmblüter-Typen — etwa 5% — negativ aus, und es ist nach MINKEWITSCHS Ansicht „ratsam, bei der Bestimmung fäkalen Verunreinigungen mit diesen Stämmen nicht zu rechnen.“ Alle übrigen Formtypen der *Coli-Aerogenes*-Gruppe werden demnach nicht als charakteristische Indikatoren für durch Warmblüter verursachte frische Fäkal-Verunreinigungen gewertet, also auch die citratpositiven Zwischenformen nicht.

Diese werden von KOSER (1924, 1926) und anderen amerikanischen Forschern als bodenheimische Rassen aufgefaßt, während MINKEWITSCH (1930) sie ihrer Herkunft nach zum einen Teil für Kaltblütertypen hält, die charakteristisch für die Darmflora der Insekten<sup>1</sup> und niederen Vertebraten sind, durch deren Exkremente sie in den Boden und ins Wasser gelangen. Zum anderen Teil deutet MINKEWITSCH (1936) diese Formen auch als aus Warmblüter-*Coli* abgewandelte Typen, deren im Laufe einer längeren Zeitspanne in atypischem Milieu veränderte Eigenschaften aber auf ihre Herkunft aus einer zeitlich weiter zurückliegenden und daher hygienisch nicht mehr bedenklichen Fäkalverunreinigung schließen lassen.

<sup>1</sup> In diesem Zusammenhange sei noch bemerkt, daß MINKEWITSCH auch *Paracoli*-Formen aus Insekten isolieren konnte, die im übrigen den hier vorliegenden *Paracoli*-Typen recht ähnlich sind.



Tab. 5 gibt Auskunft über den zahlenmäßigen Anteil, den die einzelnen, in den Versuchen gefundenen Formtypen an der Gesamt- und Teilzahl der aus 2%- und 8% igem Bier isolierten Stämme haben. Außerdem ist

Tabelle 5.

Lfd. Nr.	Formtypen	Stämme in 2% Bier (22 Proben)	Stämme in 8% Bier (19 Proben)	Anzahl der Stämme in		
				2% Bier	8% Bier	Gesamt
1	<i>Aerobacter cloacae</i> Gel. + Glyc. [S] bwgl. Ind. — H <sub>2</sub> S +	H27 K18 U37 H29 G11 B5 V31 V32	18a 9b 2c 1c 7b	8	5	13
2	<i>Aerobacter cloacae</i> , var. Gel. — Glyc. [S] bwgl. Ind. — H <sub>2</sub> S +	D10	10a	1	1	2
3	<i>Aerobacter aerog.</i> { Ind. — H <sub>2</sub> S —	R23		1		1
4	Gel. — Glyc. + unbwgl. { Ind. — H <sub>2</sub> S +	H26		1		1
5	{ Ind. + H <sub>2</sub> S +		9a		1	1
6	Interm. Form, <i>cloac.</i> verwdt. Gel. + Glyc. [S] bwgl. V.P. + Ind. — H <sub>2</sub> S +	G12 B4 B6 M24 U36 J14 R22 D9	8b 3a 4a 7a	8	4	12
7	Interm. Form, <i>cloac.</i> var. verwdt. Gel. — Glyc. [S] bwgl. V.P. + Ind. — H <sub>2</sub> S +		8a		1	1
8	Interm. Form, <i>aerog.</i> verwdt. Gel. — Glyc. + unbwl. V.P. ± Ind. — H <sub>2</sub> S — ± 19c: V.P. —	R19 D8 A4 R20 J13 J15	2b 1b 19c	6	3	9
9	Interm. Form, <i>aerog.</i> verwdt. Gel. — Glyc. + unbwgl. V.P. ± Ind. — H <sub>2</sub> S +	A2 A3	7c 17a	2	2	4
10	Interm. Form, <i>aerog.</i> verwdt. Gel. — Glyc. + unbwgl. VP. + od. ± Ind. + H <sub>2</sub> S +		5a 5b 5c 6a		4	4
11	(Int. F.) <i>Esch. freundii</i> , <i>Aerob.</i> verwdt. Gel. — Glyc. + bwgl. V.P. + od. ± Ind. — H <sub>2</sub> S +		19a 19b		2	2
12	(Int. F.) <i>Esch. freundii</i> , <i>Esch. c.</i> verwdt. Gel. — Glyc. [S] bwgl. V.P. — Ind. + H <sub>2</sub> S +	R21 M25 R18 H30		4		4
13	(Int. F.) <i>Esch. freundii</i> , <i>Esch. c.</i> verwdt. Gel. — Glyc. + bwgl. V.P. — Ind. — H <sub>2</sub> S +	K16 K17		2		2
14	(Int. F.) <i>Esch. freundii</i> , <i>Esch. c.</i> verwdt. Gel. — Glyc. + unbwgl. V.P. — Ind. — H <sub>2</sub> S +	U35	1a 3b 3c	1	3	4
15	Interm. Form, irregul. Citr. neg. Gel. — Glyc. + bwgl. Citr. — V.P. + Ind. — H <sub>2</sub> S +		6b		1	1
16	<i>Paracolon. aerogenoides</i> Lact. — b. 25°C Citr. + Ind. — H <sub>2</sub> S + unbwgl. b. 25°C V.P. +	T34	4b	1	1	2
17	<i>Paracolon. intermedium</i> Lact. — b. 25°C Citr. — Ind. — H <sub>2</sub> S + bwgl. b. 25°C V.P. —	T33		1		1
18	<i>Esch. coli</i> , Kaltbl. Typ, b. 25°C schwach V.P.(+) Hs. + Ur. — Ha. — Glyc. [S] bwgl. b. 37°C V.P. — Ind. —		12a		1	1
19	<i>Esch. coli</i> , Kaltbl. Typ. Hs. — Ur. — Ha. + Glyc. + bwgl. Ind. +	A1 L7		2		2
20	<i>Esch. coli</i> , Warmbl. Typ Hs. — Ur. + Ha. — Glyc. + bwgl. Ind. + Hs. — Ur. — Ha. — Glyc. + bwgl. Ind. +	H28 (Ur. +)	2a (Ur. —)	1	1	2

*Esch. coli* (Warmbl. Typ) in %, bezogen auf sämtliche Stämme 2,9%  
 „ „ „ „ „ „ „ „ „ die Stämme aus 2% igem Bier 2,5%  
 „ „ „ „ „ „ „ „ „ die Stämme aus 8% igem Bier 3,8%

*Esch. coli* (Warmbl. Typ) in %, bezogen auf sämtliche Proben 4,9%  
 „ „ „ „ „ „ „ „ „ die Proben aus 2% Bier 4,5%  
 „ „ „ „ „ „ „ „ „ die Proben aus 8% Bier 5,2%

ihr zu entnehmen, daß nur je in einer der 22 untersuchten 2% igen und 19 untersuchten 8% igen Bierproben mit Sicherheit ein Warmblüter-*Coli*-Stamm (H 28 bzw. 2a) nachzuweisen war, wonach sich 4,5% der 2% igen und 5,2% der 8% igen Bierproben als mit fäkalem Warmblüter-*Coli* infiziert errechnen lassen.

Alle anderen noch gefundenen Formtypen können nach den oben dargelegten Richtlinien nicht als charakteristische Indicatoren für frische Warmblüter-Fäkalverunreinigungen gelten. Dies gilt außer für die Formtypen der Nummern 1—14 (Tab. 5), welche *Aerobacter*-Formen oder citratpositive und zum Teil sogar VP-positive Intermediärformen mit negativem Verhalten in der BULIR-Probe sind, auch für die Formtypen der Nummern 15—19; denn die zwar citratnegative Intermediärform 6b ist VP-positiv und die *Paracoli*-Stämme T 34, 4b und T 33 sind bei 25° C citratpositiv und überdies, außer T 33, auch VP-positiv (vgl. auch Tab. 4a, folg. Mittlg.). Zudem weisen sie ein unterhalb 37° C liegendes Wachstums- und Gär-Temperaturoptimum auf und verhalten sich dementsprechend in der BULIR-Probe negativ, wodurch sie jedenfalls nicht als Warmblüter-*Coli*-Formen charakterisiert sind. Ein ganz ähnliches Verhalten zeigen auch 12a und die Stämme A 1 und L 7, die zwar eine coligleiche IRK aufweisen, aber auf Grund ihres negativen Verhaltens in der BULIR-Probe und noch anderer vom Normaltyp des Warmblüter-*Coli* abweichender Eigenschaften, z. B. hinsichtlich der N-Quellenverwertung, als Kaltblütertypen eingestuft wurden. Zumindest aber sind sie mit diesen Eigenschaften jedenfalls nicht als Indicatoren für eine frische und daher hygienisch bedenkliche Warmblüter-Fäkalverunreinigung anzusehen.

Die Behandlung der Frage, inwieweit nach diesen Befunden die Vornahme eines *Coli*-Nachweises in Brauereien zu fordern ist, wird an anderer Stelle veröffentlicht werden.

Hier genüge die kurze Andeutung, daß die vorliegenden Ergebnisse die Gefahr der Infektion von Bier durch Krankheitserreger aus Fäkalverunreinigungen als äußerst gering erscheinen lassen. Andererseits schließen sie eine solche Möglichkeit doch nicht ganz restlos aus. Schwachprozentige Biere (auch Limonaden u. dgl.) und die zu deren Herstellung dienenden Verschnitt- und Reinigungswässer sollten daher, um jede Eventualität der Verbreitung von Krankheitserregern durch solche Getränke auszuschließen, eine hygienische Überwachung durch Vornahme eines *Coli*-Testes erfahren. Diese Getränke sind nämlich ohne bactericide Wirkung und machen nur eine kurze Lagerzeit durch, weshalb man bis zu ihrem Ausschank mit der Abtötung u. U. doch einmal in sie hineingelangter Krankheitskeime kaum rechnen kann. Bei Vollbieren dagegen ist diese Unsicherheit nicht gegeben, denn sie werden sehr lange gelagert und haben infolge ihres niedrigeren pH-Wertes und ihres erhöhten Alkohol- und Hopfengehaltes eine wesentlich höhere bactericide Wirkung als schwachprozentige Erzeugnisse. Eine besondere hygienische Überprüfung von Vollbier durch Vornahme eines laufenden *Coli*-Nachweises kann also kaum zur Forderung erhoben werden.

### Zusammenfassung.

69 *Coli-Aerogenes*-Stämme aus 41 Proben 2% - und 8% iger Biere wurden eingehend auf ihre morphologischen, kulturellen und biochemischen Eigenschaften untersucht. Die meisten wichen von den coliformen Arten des BERGEYSchen Systems in verschiedenen Merkmalen ab.

In Anlehnung zwar an das BERGEYSche Einteilungsprinzip, aber unter Berücksichtigung dieser Abweichungen, wurden die Stämme daher in 20



verschiedene Formtypen aufgeteilt, deren Charakterisierung in Tab. 5 zusammenfassend wiedergegeben ist.

Weitaus am häufigsten traten *Aerobacter*- und citratpositive Intermediär-Formen auf. Weiterhin fanden sich außer einem citratnegativen Intermediärtyp und einigen *Paracoli*-Formen, die aber nicht als Warmblüter-Typen eingestuft werden konnten, noch einige *Coli*-Typen, die dem Kaltblüter-Typus zuzurechnen waren. Schließlich wurden noch 2 *Escherichia coli*-Stämme gefunden, die sich als typische Warmblüterformen erwiesen, je einer aus 2% - und 8% igem Bier stammend.

Somit enthielten nur jeweils etwa 5% der untersuchten 2% - und 8% igen Biere typische Warmblüter-*Coli*-Formen.

### Literatur.

- BARRITT: J. of Path. **42**, 441 (1936); **44**, 679 (1937). — BERGEY: Manual of Determinative Bacteriology, 6. Ed. Baltimore: Williams a. Wilkins 1948. — BORMAN, E. K., C. A. STUART and WHEELER: J. Bacter. **48**, 357 (1944). — BULÍR, J.: Arch. f. Hyg. **62**, 1 (1907). — BUNKER, G. C., E. J. TUCKER and H. W. GREEN: J. Bacter. **3**, 493 (1918). — CHEVALIER, M.: Pet. J. Brass. **54**, 186 (1946). — DEMETER, K. J.: Handb. d. landw. Bakt. Bd. 1, T. II, 1. Berlin: Bornträger 1941. — DORNER, W.: Meth. z. Untersuchung v. Bakterienreinkulturen (Deutsche Übertrg. des Man. of Pure Cult. Study of Bacter., 1932). Hannover: M. u. H. Schaper 1933. — DORNER, W., a. HELLINGER: J. Bacter. **29**, 16 (1935). — GOTTSACKER, E.: Zbl. Bakter. I **129**, 517 (1933). — HELM, E.: Schweiz. Brauerei-Rundschau. Kongreß-Sondernummer 1949. — HOMPESCH, H.: Die Brauwelt **1947**, H. 11, 225. — Brauwissenschaft **1949**, H. 2, 17. — KOSER, S. A.: J. Bacter. **9**, 59 (1924); **11**, 409 (1926). — KOVÁCS, N.: Z. Immun.forschg **55**, 311 (1928). — MITCHELL, N. B., and M. LEVINE: J. Bacter. **36**, 587 (1938). — MINKEWITSCH, I. E.: Z. f. Hyg. **111**, 180 (1930). — MINKEWITSCH, I. E., D. J. RABINOWITSCH u. F. S. JOFFE: Zbl. Bakter. I **137**, 152 (1936). — OLSEN, E., u. J. POULSEN: Svensk Bryggeritidskrift **63**, 204 (1948). — OLZEWSKI, W., u. O. SPITTA: Unters. u. Beurt. des Wassers u. des Abwassers. Berlin: Springer 1931. — PARR, L. W.: J. Bacter. **36**, 1 (1938). — RUCHHOFT, C. C., J. G. KALLAS, B. CHINN a. E. W. COULTER: J. Bacter. **21**, 407 (1931); **22**, 125 (1931). — SCHWESCHNIKOWA, I. A.: Laboratoriumspraxis Nr. 5, (1941) 5 (russisch). Ref. v. GORDIENKO, M.: Zbl. Bakter. II **106**, 226 (1944). — Soc. Amer. Bact.: Manual of Methods of Pure Culture Study of Bacteria, **1937**, 17. — TRITSLER, R. P., a. L. A. SANDHOLZER: Amer. J. Publ. Health. **27**, 1240 (1937). — VAUGHN, R. H., a. M. LEVINE: J. Bacter. **44**, 498 (1942). — WALDEE: Jowa State Coll. J. Sci. **19**, 435 (1945). — WERKMAN, C. H., a. G. F. GILLEN: J. Bacter. **23**, 167 (1932).

(Aus dem Institut für Gärungstechnik und Gärungsphysiologie  
der T. H. München/Weihenstephan.)

## Beiträge zur Kenntnis der coliformen Bakterien nieder- und mittelprozentiger Biere und zur Klärung der Formen-Verwandtschaft innerhalb der Coli-Aerogenes-Gruppe<sup>1</sup>.

### II. Zur Frage der Formen-Verwandtschaft innerhalb der Coli-Aerogenes-Gruppe.

Von  
A. UHL.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 16. April 1951.)

Bei den Klassifizierungsversuchen der in der I. Mitteilung beschriebenen *Coli-Aerogenes*-Stämme konnte festgestellt werden, daß mehrere von diesen während der 3—5 monatigen Versuchsperiode nach ihrer Isolierung (als „1. Mutterstamm-Phase“ bezeichnet) sich bei wiederholten Testierungen in der MR- und VP-Probe<sup>2</sup> inkonstant verhielten: Citratpositive Stämme mit positiver VP-Reaktion in den allerersten Testierungen nach ihrer Isolierung zeigten eine negative, später aber eine positive MR-Reaktion, oder aber citratpositive Stämme mit ursprünglich positiver MR-Probe ergaben eine positive, bei späteren Testierungen eine negative VP-Reaktion. Das würde also — als Beispiel sei ein indolnegativer Typ gewählt — im ersten Falle einer Abwandlung vom *Aerobacter*-Typ — — ++ zum Intermediärtyp — + + +, im letzteren Falle einer solchen von der Intermediärform — + + + zur Intermediärform — + — + gleichkommen. Auch nach Abschluß der Klassifizierungsversuche traten bei verschiedenen Stämmen während der nächsten Weiterzüchtung (als 2. Mutterstamm-Phase bezeichnet) derartige oder noch zu erwähnende Veränderungen in der MR- und VP-Probe auf.

RUCHHOFF u. Mitarb. (1931) führen die Inkonzanz der Imvic-Teste gewöhnlich auf eine Verunreinigung der Testkulturen durch artfremde Formen zurück und sehen daher gerade in der Konstanz der Imvic-Teste das beste Kriterium für die Artreinheit eines coliformen Stammes. Von anderen Autoren, u. a. von STUART u. Mitarb. (1938) und neuerdings auch von ORNSTEIN (1950), konnte andererseits festgestellt werden, daß die Imvic-Reaktionen selbst bei hochgereinigten Stämmen sich über längere Zeitabschnitte hinaus häufig nicht konstant verhalten.

<sup>1</sup> Gekürzte Wiedergabe einer Habilitationsschrift, die 1950 bei der T. H. München eingereicht wurde.

<sup>2</sup> In = Indolprobe, VP = Voges-Proskauer-Probe, MR = Methylrot-Probe, Ci = Citratprobe.



Im vorliegenden Falle brauchte nun kaum mit nicht genügender Reinheit der Ausgangskulturen gerechnet zu werden, da jeder Stamm über eine 5fache Endoplattenserie unter Zwischenschaltung von nur einigen Stunden alten St. II-Bouillon-Kulturen gereinigt worden war, womit die von RUCHHOFF u. Mitarb. (1931) für die Reinigung der Kulturen aufgestellten Forderungen mehr als erfüllt waren. Umso wahrscheinlicher war es, daß diese Stämme sich in einem instabilen Entwicklungszustand befanden und in allmählicher Selektion von im Laufe der Weiterzüchtung aufgetretenen „Bakterienmutationen“ oder „Dauermodifikationen“ variierten, zumal auch eine gewisse Gleichförmigkeit in der Abwandlungsrichtung erkennbar war.

Die Bestätigung dieser Vermutung konnte eine nach vorausgegangener längerer Züchtungsperiode vorgenommene Reinigung und daran sich anschließende nochmalige Gesamttestierung der Stämme erbringen. War die in der 1. und 2. „Mutterstamm-Phase“ beobachtete Imvic-Variabilität der Stämme durch schon ursprünglich mit artfremden Bakterien verunreinigte Ausgangskulturen oder gegebenenfalls durch sekundäre Infektionen bedingt, so mußten die durch Abimpfung und Weiterführung der extremst verschiedenen Kolonieformen eines „Mutterstammes“ neu gewonnenen „Tochterstämme“ in den meisten Fällen nicht nur in ihren Imvic-Reaktionen, sondern auch in den übrigen Testen, und zwar mit grundsätzlicher Artverschiedenheit, voneinander und vom ursprünglichen „Mutterstamm“ abweichen. War dies aber nicht der Fall, so war anzunehmen, daß es sich bei den Veränderungen der Stämme um Abwandlungen handelte, die offenbar auf einer spezifischen Instabilität ihres Entwicklungszustandes beruhten. Traten dann auch bei den „Tochterstämmen“ erneut solche Abwandlungsvorgänge auf, so konnte man aus deren Verlaufsrichtung möglicherweise sogar einen Einblick in das Verwandtschaftsgefüge der *Coli-Aerogenes*-Gruppe gewinnen.

### A. Versuche zur Klärung der Abwandlungserscheinungen der Versuchsstämme.

Alle in der I. Mitteilung beschriebenen Versuchsstämme wurden 4 Monate nach Abschluß der Klassifizierungsversuche (7—9 Monate nach ihrer Isolierung) nochmals über eine 3fache Reinigungsplattenserie (Endo-EMB-Endo) gegeben. Erwiesen sich die Kolonien auf der 1. Platte als einheitlich, so wurde nur eine derselben über die beiden nachfolgenden Reinigungsplatten als „einzeln abgezweigter Tochterstamm“ weitergeführt. Waren sie verschiedenartig, so wurden jeweils die beiden verschiedensten als „parallel abgezweigte Tochterstämme“ auf gleiche Weise weitergezüchtet. Meist traten übrigens nur geringfügige Unterschiede hinsichtlich Färbung, Fuchsinglanz, Oberflächenbeschaffenheit usw. auf.

Mit den so gewonnenen Tochterstämmen erfolgte während der kulturellen Weiterzüchtung („Tochterstamm-Phase“) wiederum eine Gesamt-Testierung (Methodik: s. I. Mitteilung). Alle bei 37° C negativ verlaufenen Teste wurden bei 25° C wiederholt. Die Werte für die  $H_2:CO_2$ -Quotienten sind in dieser Versuchsserie bei 30° C

gewonnen worden. Bei ihrer Beurteilung im Vergleich zu den für die Mutterstämmen (bei 37° C) erhaltenen ist zu berücksichtigen, daß von keinem der Tochterstämmen (bei 30° C) — wie es umgekehrt bei manchen Mutterstämmen (bei 37° C) der Fall war — nur Säure, sondern ganz regulär von jedem stets auch Gas gebildet wurde. Deshalb konnte für sämtliche Tochterstämmen jeweils ein wirkliches, zahlenmäßiges  $H_2$ : $CO_2$ -Verhältnis ermittelt werden, was im Falle der Mutterstämmen — eben infolge des teilweisen Ausbleibens der Gasbildung bei 37° C — nicht für alle gelang [vgl. die Angabe S (nur Säurebildung) in Tab. 1—4, I. Mittlg.]. Die MR- und VP-Teste und etwas weniger häufig die Indol- und Citrat-Teste wurden in verschiedenen Zeitabständen 3—5 Monate lang bei 37° C, gegen Ende der Versuchsserie auch bei 25° C wiederholt. Die Testergebnisse der mit den Tochterstämmen vorgenommenen Gesamt-Testierung sind in den Tab. 1a—4a zusammengestellt. Die Angaben bezüglich der Imvic-Teste stellen Durchschnittsbewertungen wiederholter Versuche dar. „Parallel abgezweigte Tochterstämmen“ sind mit dem Index /1 und /2 gekennzeichnet. Von R 19 stammen also z. B. die Stämme R 19/1 und R 19/2. Hinsichtlich der Zeichenerklärung sei auf die I. Mitteilung verwiesen (S. 101); die zum Vergleich dienenden Versuchsergebnisse der „1. Mutterstamm-Phase“ finden sich dort in Tab. 1—4.

### B. Beurteilung der Ausgangskulturen auf ihre Artreinheit.

Ein Vergleich zwischen den Mutterstämmen in Tab. 1—4 (I. Mitteilung) und den Tochterstämmen in Tab. 1a—4a — vorläufig ohne deren Verhalten in den Imvic-Testen zu berücksichtigen — zeigt, daß sich durch die nochmalige Reinigung der Mutterstämmen nicht in einem einzigen Falle Tochterstämmen abtrennen ließen, die sich gegenüber ihren Mutterstämmen — und gegebenenfalls auch paarweise untereinander — als so grundsätzlich verschieden erwiesen hätten, daß man das Vorliegen schon ursprünglich nicht artreiner Ausgangskulturen hätte annehmen müssen. Waren überhaupt — abgesehen von den Veränderungen der MR- und VP-Probe — Unterschiede zwischen Mutter- und Tochterstämmen aufgetreten, so gewöhnlich nur solche gradueller Natur, die sich zumeist auf geringfügige Intensitätsunterschiede im Verhalten der Stämme bei diesem oder jenem Test beschränkten.

So zeigte ein Teil der Tochterstämmen bei der Vergärung einiger C-Quellen eine Verschiebung (Senkung) des Temperaturoptimums, was sich durch eine Verminderung der Gasbildung und Erhöhung der Säurebildung bei den 37° C-Versuchen kundtat, während bei 25° C normale Gasbildung auftrat. Verhältnismäßig häufig war bei Tochterstämmen (Tab. 2a u. 3a) die Reduktionskraft gegenüber Neutralrot mehr oder weniger stark vermindert. Einige Tochterstämmen legten die Milch nur mehr vorübergehend dick (Tab. 2a). Selten hatte ein Tochterstamm die Fähigkeit zur Milchkoagulation ganz verloren, wie A 3/2 (Tab. 2a), der überdies auch von seinem Schwesterstamm mit dieser Eigenschaft abwich, was übrigens einer der wenigen Fälle ist, wo die beiden korrespondierenden Tochterstämmen nicht volle Übereinstimmung zeigten. In einer Stamm-Gruppe der Tab. 1a (Gr. B) trat die Fähigkeit, bei 25° C  $\alpha$ -Methylglucosid schwach vergären zu können, bei einigen Tochterstämmen neu auf. Dabei ist aber zu beachten, daß schon einige Mutterstämmen dieser Stamm-Gruppe die gleiche Fähigkeit besaßen, und daß bei 37° C nach wie vor alle diese Tochterstämmen gleich den Mutterstämmen einen negativen Befund ergaben. Auch hinsichtlich des Neuauftretens der Inulin-Vergärung bei einigen Tochterstämmen in Tab. 2a ist zu berücksichtigen, daß die



Vergärung von Inulin durch diese Stämme meist erst nach dem 12. Tage einsetzte. Die Beobachtungszeit bei den Mutterstamm-Versuchen dauerte aber nur 7—9 Tage, so daß die Inulin-Vergärung vielleicht nicht festzustellen war.

Solche und ähnlich zu bewertende, verhältnismäßig geringfügige Unterschiede zwischen manchen Mutter- und Tochterstämmen dürfen kaum als Artunterschiede aufgefaßt werden, da sie nicht grundsätzlicher Art sind und nicht in einem einzigen Falle den Verdacht rechtfertigen, es habe sich bei irgend einem der Mutterstämmen um ein Formengemisch gehandelt. Sie lassen sich vielmehr, in Anbetracht des sonst jeweils den Mutterstämmen weitgehend gleichgebliebenen Charakters der Tochterstämmen, nur als Abwandlungen deuten, die bei der auf die Isolierung erfolgten Weiterzucht der Stämme auftraten und die in einer Individuen-Abwandlung, gefolgt von züchtungsbedingten Selektionsvorgängen und von einer beim Reinigungsakt gegebenenfalls erfolgten Abspaltung, ihre Ursache haben mögen.

Demnach müssen auch die Veränderungen, in den Imvic-Reaktionen als Abwandlungen im Laufe der Weiterzucht der Stämme gedeutet werden. Diese sollen nachfolgend genauer besprochen werden.

### C. Besprechung der Imvic-Abwandlungsergebnisse.

#### 1. Vergleich zwischen Tabelle 1 und 1a.

Aus dem Vergleich der bei 37° C für die Mutterstämmen gewonnenen Imvic-Ergebnisse in Tab. 1 (I. Mttlg.) mit den Werten für die Tochterstämmen in Tab. 1a, ersehen wir, daß die Stämme G 12—R 22, die bei der 1. Testierung alle noch MR-negativ waren, schon in der 1. Mutterstamm-Phase (Tab. 1) positiv wurden und schließlich im Verlauf ihrer Weiterzüchtung diese Eigenschaft stabilisierten, womit der intermediäre Charakter dieser Stämme konstant wurde. Bei den Tochterstämmen von G 12 war dieser Zustand allerdings nicht ganz erreicht worden, denn beide zeigten in der Tochterstamm-Phase noch je einen Rückschlag zur *Aerobacter*-Form. Stamm D 9 ging in seiner intermediären Tendenz noch weiter, indem er seine früher noch variable MR-Reaktion positiv ausrichtete und dafür die Fähigkeit, Acetoin zu bilden, verlor. Ähnlich verhielt sich auch Stamm 7a, der allerdings in einem Versuch noch einmal die für *Aerobacter* typischen Reaktionen zeigte.

Alle übrigen Stämme des Tabellenpaares, nämlich sämtliche in Gruppe A sowie 3a und 4a in Gr. B, verhielten sich während der ganzen Versuchszeit, sowohl in der Mutter- wie in der Tochterstammphase, mit ihrem ursprünglich gezeigten Imvic-Verhalten konstant, und zwar erstere als *Aerobacter*-Typen, letztere als Zwischenformen mit der IRK — + + +. Bezüglich der 25° C-Imvic-Versuche sei noch bemerkt, daß die beiden letzten Formen der Tab. 1a bei 25° C noch stärkere Neigung zur Acetoinbildung zeigten als bei 37° C, während bei allen übrigen Stämmen die Ergebnisse bei beiden Temperaturen im wesentlichen übereinstimmten.

Tabelle 1a (Fortsetzung siehe gegenüberliegende Seite).

25° C				37° C														
Indol	M. R.	V. P.	Citrat	Gruppe	Stämme	Beweglichkeit Gel. Verfl.	Indol	M. R.	V. P.	Citrat	Harnsäure Uracil	Harnstoff	Mannit	Glucose	Lactose	Saccharose		
—	—	+	+	A	H 27/1 <sub>2</sub>	+	+	—	—	+	+	+) + +!	+	+	+•	+		
—	—	+	+		K 18/1	+	+	—	—	+	+	+) ± ±!	+	+	+•	+		
—	—	+	+		K 18/2	+	+	—	—	+	+	+) (±) ±!	+	+	S+:	+		
—	—	+	+		18a/1 <sub>2</sub>	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	
—	—	+	+		9b/1 <sub>2</sub>	+	(—)	—	—	+	+	+	+	+	+	+•	+	
—	—	+	+		X*)	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+•	+	
—	—	+	+		G 11/1	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	
—	—	+	+		G 11/2	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+•	+	
—	—	+	+		7b/1 <sub>2</sub>	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	S+:	+	
—	—	+	+		B 5/1 <sub>2</sub>	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	S+:	+	
+	—	+	+		V 31	—	+	—	—	+	+	—	—	±,	+	+	+•	—
—	—	+	+		V 32/1	—	+	—	—	+	+	—	—	±,	+	+	+•	—
—	—	+	+	V 32/2	—	+	—	—	+	+	—	—	±,	+	+	+•	—	
—	+	+	+	B	G 12/1	+	+	—	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	
—	+	+	+		G 12/2	+	+	—	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	
—	+	+	+		B 4	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
—	+	+	+		B 6	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
—	(+)	+	+		M 24	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
—	+	+	+		8b	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
—	+	(+)	+		U 36	+	+	—	+	+	+	+	+	+	S+	+	+	
—	+	+	+		J 14	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
—	+	+	+		R 22	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
—	+	+	+		3a	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
—	+	+	+		4a	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
—	+	(+)	+		D 9	+	+	—	+	—	+	—	—	+	+	+	+•	
—	(+)	+	+	7a	+	+	—	(+)	±	+	—	—	+	+	+	+		

\*) X = 2 c/1<sub>2</sub>, 1 c/1<sub>2</sub>, U 37/1<sub>2</sub>, H 29/1<sub>2</sub>.

Tabelle 1a (Fortsetzung von vorheriger Seite).

Saccharin	Dulcit	Inosit	Adonit	Glycerin	Cellobiose	Raffinose	Maltose	Xylose	$\alpha$ -Meth.	Inulin	Lackm. Milch		Neutr. Red.	$H_2:CO_2$	Bullr 45° C (Eijkm.)		$H_2S$ -Bildung
+	—	—	+	(S)	+	+	+	+	+	—	S <sup>CO</sup> <sub>6</sub> R	R	1:2	—	5,3	mäß	++
+	—	—	+	(S)	+	+	+	+	+	—	S <sup>CO</sup> <sub>5</sub> R	R	1:1,6	—	5,2	mäß	++
+	—	—	+	(S)	+	+	+	+	+	—	S <sup>CO</sup> <sub>6</sub> R	R	1:1,6	—	5,0	mäß	++
+	—	—	—	(S)	+	+	+	+	+	—	S <sup>CO</sup> <sub>3</sub> R	R	1:1,5	—	6,6	—	++
+	—	(S)	—	(S)	+	+	+	+	+	—	S <sup>CO</sup> <sub>4</sub> R	R	1:1,5	—	5,0	mäß	++
+	—	(S)	—	(S)	+	+	+	+	+	—	S <sup>CO</sup> <sub>5</sub> R	R	1:1,6	—	5,5	ger	++
+	—	(S)	—	(S)	+	+	+	+	+	—	S <sup>CO</sup> <sub>3</sub> R	R	1:1,6	—	5,3	mäß	++
+	—	(S)	—	(S)	+	+	+	+	+	—	S <sup>CO</sup> <sub>4</sub> R	R	1:1,9	—	5,1	mäß	++
+	—	(S)	—	(S)	+	—	+	+	+	—	S <sup>CO</sup> <sub>5</sub> R	R	1:1,5	—	5,7	ger	++
+	—	—	—	(S)	+	—	+	+	—	—	S <sup>CO</sup> <sub>11</sub> R	R	1:1,4	—	—	—	++
+	+	—	—	(S)	+	—	+	+	+	—	S — R)	R	1:1,5	—	—	—	+
+	+	—	—	(S)	+	—	+	+	+	—	S <sup>CO</sup> <sub>7</sub> R	R	1:1,6	—	5,8	ger	+
+	+	—	—	(S)	+	—	+	+	+	—	S <sup>CO</sup> <sub>11</sub> R	R	1:1,4	—	6,3	—	+
+	+	—	—	(S)	+	+	+	+	+	—	S <sup>CO</sup> <sub>5</sub> R	(R)	1,2:1 1:1,2	—	—	—	+
+	+	—	—	(S)	+	+	+	+	+	—	S <sup>CO</sup> <sub>5</sub> R	(R)	1:1,8	—	—	—	+
S <sup>+</sup> <sub>+</sub> )	+	—	—	(S)	S <sup>+</sup> <sub>+</sub>	+	+	+	—	—	S <sup>CO</sup> <sub>5</sub> R	R)	1,8:1	—	—	—	+
S <sup>+</sup> <sub>+</sub> )	+	—	—	(S)	+	+	+	+	—	—	S <sup>CO</sup> <sub>4</sub> R	R)	1:1,2	—	—	—	+
S <sup>+</sup> <sub>+</sub> )	+	—	—	(S)	S <sup>+</sup> <sub>+</sub>	+	+	+	—	—	S <sup>CO</sup> <sub>5</sub> R	R)	1:1,3 1,2:1	—	—	—	+
S <sup>+</sup> <sub>+</sub> )	+	—	—	(S)	S <sup>+</sup> <sub>+</sub>	+	+	+	+	—	S <sup>CO</sup> <sub>4</sub> R	R)	1:1,6	—	—	—	+
S <sup>+</sup> <sub>+</sub> )	+	—	—	(S)	+	+	+	+	+	—	S <sup>CO</sup> <sub>4</sub> R	(R)	1:1,5	—	—	—	+
S <sup>+</sup> <sub>+</sub> )	+	—	—	(S)	S <sup>+</sup> <sub>+</sub>	+	+	+	+	—	S <sup>CO</sup> <sub>5</sub> R	(R)	1,6:1 1:1,3	—	—	—	+
S <sup>+</sup> <sub>+</sub> )	+	—	—	(S)	+	+	+	+	+	—	S <sup>CO</sup> <sub>4</sub> R	R)	1,4:1	—	—	—	+
S <sup>+</sup> <sub>+</sub> )	+	—	—	(S)	S <sup>+</sup> <sub>+</sub>	+	+	+	+	—	S <sup>CO</sup> <sub>4</sub> R	R)	1:1,8	—	—	—	+
S <sup>+</sup> <sub>+</sub> )	+	—	—	(S)	S <sup>+</sup> <sub>+</sub>	+	+	+	+	—	S <sup>CO</sup> <sub>5</sub> R	R)	1,5:1 1:1,4	—	—	—	+
+	+	—	—	(S)	+	+	+	+	+	—	S <sup>CO</sup> <sub>6</sub> R	(R)	1,3:1	—	—	—	+
S <sup>+</sup> <sub>+</sub> )	+	—	—	(S)	S <sup>+</sup> <sub>+</sub>	—	+	+	+	—	S <sup>CO</sup> <sub>4</sub> R	—	1:1	—	—	—	++



Solche Veränderungen verschiedener Stämme im Sinne einer Abwandlung von der *Aerobacter*-Stufe zum Intermediär-Typ —+++ oder von diesem zum Intermediär-Typ —++ sind besonders klar zu überblicken, wenn wir uns die in den Mutter- und Tochterstamm-Phasen wiederholt ermittelten Imvic-Reaktionskombinationen in zeitlich geordneter Reihenfolge vergegenwärtigen. Als Beispiel seien in Tab. a die Reaktionen von 8b, J 14 und D 9 wiedergegeben.

Tabelle a.

	n. Mtn.	8b					n. Mtn.	J 14					n. Mtn.	D 9				
		In	MR	VP	Ci			In	MR	VP	Ci			In	MR	VP	Ci	
37° C M.St.	0	—	—	+	+		0	—	(—)	+	+		0	—	+	+	+	
	2	—	—	+	+		2	—	(+)	+	+		2	—	(—)	+	+	
	3	—	+	+	+		5	—	+	+	+		4	—	+	+	+	
	8	—	+	+	+		9	—	+	+	+		5	—	+	+	+	
37° C T.St.	9	—	+	+	+		10	—	+	+	+		9	—	(+)	—	+	
	10	—	+	+	+		11	—	+	+	+		10	—	+	—	+	
	11	—	+	+	+		12	—	—	—	—		11	—	+	—	+	
													12	—	+	—	+	

Tabellen-Erklärung für Tab. a—g.

n. Mtn.	=	Monate n. Isol.	MR		VP	
In	=	Indol-Reaktion	p <sub>H</sub> 5,0 u. darunter	+	sehr starke Reaktion	+
MR	=	Methylrot-R.	p <sub>H</sub> 5,1—5,2	(+)	n. zieml. kräft. R.	(+)
VP	=	Vog.-Prosk.-R.	p <sub>H</sub> 5,3—5,4	(+)	mittelmäßige Reakt.	(+)
Ci	=	Citrat-Reakt.	p <sub>H</sub> 5,5—5,6	(—)	mäßige Reaktion	(+)
			p <sub>H</sub> 5,7—5,8	(—)	schwache Reaktion	(—)
M.St.	=	Mutter-Stamm	p <sub>H</sub> 5,9 u. darüber	—	minimale Reakt.	(—)
T.St.	=	Tochter-St.			negative Reaktion	—
			Anfangs-p <sub>H</sub>	7,0		

Die ersten beiden Beispiele veranschaulichen den mehrfach beobachteten Übergang von der *Aerobacter*- zur Intermediärform-Stufe —+++ , deren Stabilisierung übrigens zumeist schon bis zum Abschluß der 1. Mutterstamm-Phase (3—5 Monate nach Isolierung der Stämme) voll erreicht war. Von D 9 und 7a, die beide zwar ursprünglich bereits mit der IRK —+++ vorlagen, aber nach dem 2. Monat vorübergehend einen Rückschlag zur *Aerobacter*-Form erlitten hatten, wurde dann diese Stufe in der 2. Mutterstamm-Phase noch überschritten, und die erreichte Stufe —++ behielt D 9 in der Tochterstamm-Phase konstant bei, während der Stamm 7a allerdings, wie schon erwähnt, noch rückläufige Tendenz zeigte.

Solche rückläufigen Erscheinungen sind nicht einfach und nicht einheitlich zu deuten. Traten sie nämlich in der Mutterstamm-Phase auf, so kann es sich möglicherweise nur um eine vorübergehende Umstimmung

im Selektionsvorgang handeln. Traten sie aber auch in der Tochterstamm-Phase auf, so dürften außerdem „Rückmutationen“ in Verbindung mit vor- und rückwärts fluktuierenden Selektionsvorgängen zu ihrer Erklärung herangezogen werden müssen.

## 2. Vergleich zwischen Tabelle 2 und 2a.

Auch ein Vergleich der Mutterstämme in Tab. 2 (I. Mittlg.) mit den Tochterstämmen in Tab. 2a bezüglich ihres Verhaltens in den 37° C Imvic-Versuchen zeigt, daß hier ebenfalls verschiedentlich nach der 1. Mutterstamm-Phase Imvic-Abwandlungen weitergeschritten bzw. neu aufgetreten sind.

Der *Aerobacter*-Typ R 23 in Gruppe C wurde in der 2. Mutterstamm-Phase MR-positiv (Tab. 2a), d. h. er wandelte zum intermediären Typ —+++ ab. Die Tochterstämme von R 19, nämlich R 19/1 und R 19/2, wiesen stärker als ihr Mutterstamm die Tendenz auf, eine negative VP-Reaktion zu geben. Außerdem zeigten sie nicht mehr die beim Mutterstamm in den ersten Versuchen noch als variabel nachgewiesene Fähigkeit, bei 37° C Citronensäure zu verwerten. Bezeichnenderweise ist dieser Verlust bei solchen „Kaltstämmen“ jedoch nur temperaturbedingt, denn sie verwerteten Citrat bei 25° C, wenngleich erst nach einigen Tagen.

An dieser Stelle sei auch kurz auf die in der I. Mitt. (S. 111) geäußerte Ansicht zurückgekommen, daß es sich bei dem Stamm R 19 in Anbetracht seines negativen Verhaltens im Harnstoff- und Uraciltest (Tab. 2) wohl um eine hinsichtlich der Harnstoff- und Uracilverwertung reduzierte Form handeln würde. Diese Annahme wäre mit dem von den beiden Tochterstämmen von R 19 nach ihrer Abzweigung vom Mutterstamm gezeigten variablen Verhalten im Uraciltest eigentlich nicht recht in Einklang zu bringen, denn dieses Verhalten würde ja eher auf eine Weiterentwicklung von R 19 im Sinne der Neuerwerbung der Fähigkeit, Uracil zu verwerten, schließen lassen. Jedoch mag man bedenken, daß dieser Stamm sich hinsichtlich des Verlustes der Fähigkeit, Uracil zu verwerten, vielleicht eben noch in einem labilen Zustand befand, und daß die Tochterstämme demzufolge noch eine diesbezügliche rückläufige Tendenz, d. h. ein mitunter wieder positives Verhalten im Uraciltest zeigten, während der Verlust der Harnstoffausnützung bereits stabil geworden war.

Auch die meisten anderen Formen der Gruppe C zeigten bei ihrer an die 1. Mutterstamm-Phase angeschlossenen Weiterzüchtung mehr oder weniger starke Veränderungen der MR- und VP-Reaktion, und zwar durch Verstärkung des intermediären Charakters; er trat am deutlichsten bei J 13 und J 15 (Tab. b) hervor, denn diese beiden Stämme haben sich von —+++ nach —+—+ bis zur Konstanz dieser Kombination abgewandelt. Die Tendenz mancher Stämme, sich sogar vom *Aerobacter*-Typ her, über die Intermediärstufe —+++ hinaus, der Stufe —+—+ zu nähern, soll an dem Beispiel des Stammes 2b, in Tab. b, noch besonders veranschaulicht werden.





*Tabelle 2a. (Fortsetzung.)*

[illegible]

\* ) 6a/2: Imvic 25°C + + ( )

In Gruppe D liegen ganz ähnliche Verhältnisse vor wie in Gruppe C. Stamm H 26, der vordem *Aerobacter*-Natur aufwies, wandelte sich in der Tochterstamm-Phase ebenfalls zum intermediären Typ —+++ ab, wobei H 26/1 auf dem Wege zu dieser Intermediärstufe noch einen Rückschlag zur *Aerobacter*-Form zeigte, während H 26/2 diese Umkehrtendenz bereits überwunden zu haben schien. Die intermediären Stämme mit vordem variabler VP-Reaktion gingen mit Ausnahme von 7c in den Typus —++ über. Sie hatten schon in der 2. Mutterstamm-Phase ihr

Tabelle b.

R 23					R 19 R 19/1				
	In	MR	VP	Ci	In	MR	VP	Ci	
37° C M.St.	0	—	—	+	+	0	— (+)	+	±
	2	—	—	+	+	2	—	+	(—) ±
	5	—	(—)	+	+	4	—	+	+
	9	—	+	+	+	5	—	+	+
37° C T.St.	10	—	+	+	+	9	—	+	(+) —
	11	—	(+)	+	+	9	—	+	(—) —
	12	—	+	+	+	10	—	+	(+) —
	13	—	+	+	+	11	—	+	(+) —
					12	—	+	(—) —	
					13	—	+	(—) —	
					R 19/2				
J 13					J 15				
Mtn. n.	In	MR	VP	Ci	Mtn. n.	In	MR	VP	Ci
37° C M.St.	0	—	+	(+)	+	0	—	+	(+) +
	2	—	+	(+)	+	2	—	+	(—) +
	4	—	+	+	+	4	—	+	(+) +
	5	—	+	+	+	5	—	+	(+) +
	9	—	+	—	+	9	—	+	— +
	11	—	+	—	+	10	—	+	(—) +
37° C T.St.	10	—	+	(—)	+	11	—	+	— +
	11	—	+	—	+	12	—	+	— +
	12	—	+	—	+				
2b 2b/1					2b/2				
Mtn. n.	In	MR	VP	Ci					
37° C M.St.	0	—	(—)	+	+				
	3	—	+	(+)	+				
	7	—	+	(+)	+				
37° C T.St.	7	—	+	(—)	+		+	(+)	+
	8	—	+	(+)	+		—	+	(+)
	9	—	+	(—)	+		—	+	(+)
	10	—	+	(+)	+		—	+	(+)
	11	—	+	(—)	+		—	+	(—)

Acetoinbildungs-Vermögen eingebüßt und gaben auch in der Tochterstamm-Phase bei 37° C eine konstant negative VP-Reaktion. Nur 7c zeigte auch in seiner Tochterstamm-Phase noch einmal einen Rückschlag zum Typus —++++. Nachfolgende Beispiele in Tab. c mögen wieder zur besseren Veranschaulichung solcher Abwandlungsvorgänge dienen:

Tabelle c.

	n.	Mtn.	H 26 H 26/1				n.	Mtn.	17 a 17 a/1			
	In	MR	VP	Ci		In	MR	VP	Ci			
37° C M.St.	0	—	—	+	+	0	—	+	(+)	+		
	2	—	—	+	+	2	—	+	(+)	+		
37° C T.St.	9	—	+	(+)	+	3	—	+	+	+		
	10	—	—	+	+	7	—	+	(—)	+		
	11	—	(+)	+	+	7	—	+	—	+		
	12	—	+	+	+	8	—	+	—	+		
	H 26/2					9	—	+	—	+		
	9	—	+	(+)	+	10	—	+	—	+		
	10	—	+	+	+	17a/2						
	11	—	+	+	+	7	—	+	—	+		
	12	—	+	+	+	8	—	+	—	+		
						9	—	+	—	+		
						10	—	+	—	+		

	n.	Mtn.	A 2 A 2/1					n.	Mtn.				
	In	MR	VP	Ci		In	MR	VP	Ci				
37° C M.St.	0	—	+	+	+								
	2	—	+	(+)	+								
	3	—	+	—	—								
	7	—	+	—	+	A 2/2							
37° C T.St.	7	—	+	—	+	—	+	—	+				
	8	—	+	—	+	—	+	—	+				
	9	—	+	—	+	—	+	—	+				
	10	—	+	—	+	—	+	—	+				

Bei den indolpositiven Formen in der Tab. 2, Gruppe E, traten ähnliche, die MR- u. VP-Probe betreffende Abwandlungen auf wie in den Gruppen C und D. Es mag daher genügen, in Tab. d für zwei dieser Stämme sämtliche während der Gesamt-Versuchsperiode ermittelten Imvic-Reaktionskombinationen wiederzugeben.

Vergleichen wir nun in Tab. 2a die Ergebnisse der bei 37° C und der bei 25° C vorgenommenen Imvic-Teste, so läßt sich feststellen, daß nahezu alle Tochterstämme, die zur Intermediär-Stufe —+—+ abgewandelt oder sich ihr genähert haben, in den 25°-Versuchen noch viel deutlicher als in den 37°-Versuchen ihre frühere *Aerobacter*-Natur offenbarten. Der Verlust des Acetoin-Bildungsvermögens war also bei ihnen noch nicht



„temperaturstabil“ geworden. Nur der Tochterstamm J 13, dessen Mutterstamm durch Verlust der Fähigkeit zur Acetoinbildung von der Imvic-Stufe —+++ zur Stufe —+—+ abgewandelt hatte, bildete auch bei 25° C so gut wie kein Acetoin mehr. Bei ihm war also das Unvermögen, Acetoin zu bilden, bereits zur temperaturstabilen Eigenschaft

Tabelle d.

	n.	9a				n.	5b 5 b/1							
		In	MR	VP	Ci		In	MR	VP	Ci				
37° C M.St.	0	+	—	+	+	0	+	+	(+)	+				
	2	+	—	+	+	2	+	+	+	+				
	3	+	—	+	+	3	+	+	+	+				
	9	+	+	(—)	+	7	+	+	—	+	5b/2			
37° C T.St.	8	+	+	—	+	7	+	+	—	+	+	+	—	+
	9	+	+	—	+	8	+	+	—	+	+	+	—	+
	10	+	(+)	+	+	9	+	+	—	+	+	+	—	+
	11	+	+	—	+	10	+	+	—	+	+	+	+	+
						11	+	+	—	+	+	+	—	+

geworden und seine damit erreichte Abwandlungsstufe kommt der stabilen Entwicklungsstufe des schon ursprünglich VP-negativen Mutterstammes 19c und seiner zwei Tochterstämme gleich, die bei 25° C ebenfalls kein Acetoin zu bilden vermochten. Nicht weit entfernt von dieser Stufe sind auch die Tochterstämme J 15 und A 3/1 und schließlich auch noch 7c und A 3/2, da erstere bei 25° C nur mehr Spuren von Acetoin zu bilden in der Lage waren und letztere auch nur mehr eine schwache VP-Reaktion gaben.

### 3. Vergleich zwischen Tabelle 3 und 3a.

Die Imvic-Abwandlungen bei etlichen Stämmen der Tab. 3 bzw. 3a weisen, außer im Falle des Stammes D 10, der nach der 1. Mutterstamm-Phase zum intermediären Typ —+++ wurde, einige Besonderheiten auf, die gleich an Hand der in Tab. e zusammengestellten Einzelversuche besprochen seien.

Danach erwies sich die bei dem Mutterstamm 8a vor seiner nochmaligen Reinigung zuletzt aufgetretene Imvic-Reaktionskombination —(—)+ + gegenüber der für den Tochterstamm 8a/1 bei seiner ersten Testierung ermittelten Reaktionskombination —(—)(—)± als so verschieden, daß man hätte annehmen können, der Mutterstamm sei ein Artgemisch gewesen und bei seiner nochmaligen Reinigung hätte sich von ihm eine artfremde Form abgespalten. Jedoch erwiesen sich Mutter- und Tochterstamm in allen übrigen Eigenschaften als einander so gleichartig, daß schon aus diesem Grunde diese Annahme wenig Berechtigung hatte. Während der Weiterzüchtung erfolgte bei dem Tochterstamm 8a/1

		H <sub>2</sub> S-Bildg.																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
--	--	-------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

überdies wieder eine rückläufige Abwandlung zum Urtyp des Mutterstammes, von wo aus dann wieder eine Umkehr zur Stufe  $-+(-)+$  stattfand. Es konnte sich also bei ihm nicht um eine vom Mutterstamm

Tabelle e.

	n. Mtn.	8a 8a/1				
	n.	In	MR	VP	Cl	
37° C M.St.	0	—	—	+	+	
	2	—	—	+	+	
	3	—	+	+	+	
	7	—	(—)	+	+	
37° C T.St.	7	—	(—)	(—)	±	— (+) — ±
	8	—	+	—	±	— (+) — ±
	9	—	(+)	+	+	— (—) + +
	10	—	—	+	+	— (+) + +
	11	—	+	(+)	+	— —) — +)

	n. Mtn.	19a 19a/1				
	n.	In	MR	VP	Cl	
37° C M.St.	0	—	—	+	+	
	2	—	+	+	+	
	3	—	(+)	(+)	+	
	7	—	+	—	+	
37° C T.St.	7	—	—	—	+	— (+) — +
	8	—	—	—	+	— (+) —) +
	9	—	—	—	+	— (+) — +
	10	—	(+)	+	+	— + +) +
	11	—	(—)	—	+	— (—) — +

	n. Mtn.	3c					n. Mtn.	R 18			
	n.	In	MR	VP	Cl		n.	In	MR	VP	Cl
37° C M.St.	0	—	+	—	+		0	+	+	—	+
	3	—	+	—	+		2	+	+	—	+
	9	—	(—)	—	+		9	+	+	—	+
37° C T.St.	8	—	(—)	—	+		11	+	—	—	+
	9	—	+	—	+		10	+	(—)	—	+
	10	—	(—)	—	+		11	+	(—)	—	+
							12	+	(—)	—	+
							13	+	+	—	+

grundsätzlich artverschiedene Form handeln, sondern beim Reinigungsakt hatte sich wohl ein zur Imvic-Stufe  $— — — ±$  abgewandeltes Individuum abdissoziiert, bei dem aber die dieser Imvic-Stufe entsprechenden biochemischen Eigenschaften noch nicht stabil verankert waren. Deshalb ergab dieses Individuum einen Tochterstamm, der bei seiner 1. Testierung zunächst noch die Kombination  $— (—) (—) ±$  aufwies, bei seiner



Weiterzucht aber wieder rückläufig abwandelte. Der Partner des Tochterstammes 8a/1, nämlich 8a/2, zeigte nach seiner Abzweigung vom Mutterstamm noch nicht jene weitgehende Abwandlung zur Imvic-Stufe  $-( - ) - \pm$ . Jedoch gab er in seiner MR-Probe eine intermediäre Reaktion, woraus man schließen kann, daß auch bei ihm bereits die Tendenz vorlag, zu dieser Imvic-Stufe abzuwandeln, was dann am Ende der Tochterstamm-Phase ja auch noch deutlich zum Durchbruch kam.

Diese in bezug auf die MR- und VP-Probe sehr instabilen Stämme waren auch hinsichtlich der Verwertung von Citrat als einziger C-Quelle nicht ganz stabil. Das Wachstum im Citratmedium setzte verhältnismäßig spät, durchschnittlich erst nach dem 3. Kulturtage, ein. Zwischen dem 7. und 8. Monat der Weiterzüchtung der Stämme war der Befund überhaupt negativ. In dieser Zeit waren also für 8a sogar die Kombinationen  $-( - ) - ( - ) -$  und  $- + ) -$  möglich.

Bei den Stämmen 19a und 19b bzw. ihren Tochterstämmen trat die Kombination  $-( - ) - +$  ebenfalls verschiedentlich auf, wie aus dem Beispiel 19a in Tab. e zu ersehen ist, und die Stämme 3c und R 18 (Tab. e) zeigten in gleicher Weise die Erscheinung, zur Imvic-Stufe  $-( - ) - +$  bzw.  $+ - ) - +$  abzuwandeln. Auch sie erwiesen sich jedoch auf diesen Abwandlungsstufen als noch nicht konstant.

Abwandlungen dieser Art, die durch den Wechsel von positivem zu negativem Verhalten in der MR-Probe zu dem irregulären Imvic-Typ  $-( - ) - +$  bzw.  $+ - - - +$  führen können und die wohl am leichtesten von der Stufe  $\mp + - +$  aus stattfinden dürften, beruhen offenbar nicht auf dem Verlust der Fähigkeit, vermehrt Säure-Endprodukte zu bilden, sondern auf der Neuerwerbung einer Eigenschaft, welche sie zum vermehrten und frühzeitigen Wiederabbau der gebildeten Säure befähigt. Hierfür sprechen jedenfalls die Ergebnisse einiger Versuche, die mit in solcher Abwandlung begriffenen Stämmen durchgeführt wurden, und bei denen nach 2- und nach 4tägiger Bebrütung MR- und VP-Teste durchgeführt wurden. Bei den in Tab. f aufgeführten Stämmen fiel nach dem 2. Tage die MR-Probe positiv aus, am 4. Tage — dem üblichen Zeitpunkt der Reaktionsbestimmung — jedoch negativ. Daraus ist zu schließen, daß auch bei diesen Stämmen eine kräftige Säurebildung stattfand, daß aber die gebildete Säure vom 2. Tage ab offenbar wieder abgebaut wurde, so daß die nun erfolgende Alkalinisierung des Mediums am 4. Tage zu einer negativen MR-Reaktion führte.

Tabelle f.

		MR VP	MR VP	MR VP
37° C	nach 2 Tagen	+ ) —	+ —	+ —
	nach 4 Tagen	(—) —	(—) —	(—) —

Die in den vorliegenden Versuchen häufig beobachteten Abwandlungen verschiedener Stämme von positivem zu negativem Verhalten im VP-Test beruhen wahrscheinlich nicht auf einem Erwerb der Fähigkeit, Acetoin wieder zu verbrauchen, sondern auf einem wirklichen Verlust der Fähigkeit, Acetoin in nachweisbaren Mengen aus Acetaldehyd zu kondensieren. Denn im ersten Fall hätten die Reaktionsbestimmungen nach 2 Tagen doch wenigstens hin und wieder geringe

Mengen Acetoin aufzeigen müssen. Sämtliche Stämme aber mit negativer VP-Probe am 4. Tage waren stets auch schon nach 2 Tagen vollkommen negativ.

#### 4. Vergleich zwischen Tabelle 4 und 4a.

Unter den Stämmen des Tabellenpaares 4 und 4a traten lediglich bei den Stämmen 4b und 6b Imvic-Abwandlungen auf, die sich in den Rahmen der bisher besprochenen ohne weiteres einfügen. Das Überwechselln des bei 37° C citratnegativen *Paracoli*-Stammes 4b (Tab. g) zur Imvic-Stufe —(—)— ist auf gleiche Weise, wie die Abwandlung der bei 37° C citratpositiven Stämme 8a/1—19b sowie 3c und R 18 zur irregulären Imvic-Stufe —(—)—+ bzw. +(—)—+, durch Erlangung der Fähigkeit zum vermehrten Säureabbau zu erklären. Die Abwandlung des citratnegativen Stammes 6b (Tab. g) von der Imvic-Stufe —++— zu —+—, unter Einbuße der Acetoin-Bildungsfähigkeit, ist der eines VP- und citratpositiven Intermediärtyps von der Imvic-Stufe —+++ zu —+—+ gleichzusetzen. Da dieser Stamm sich lactosepositiv verhielt, wäre er somit, wenn der Verlust des Acetoin-Bildungsvermögens

Tabelle g.

	T 33				Mtn. n.	T 34 T 34/1				
	In	MR	VP	Cl		In	MR	VP	Cl	
37° C M.St.	0	—	+	—	0	—	+	—	—	
	2	—	+	—	2	—	+	—	—	
	5	—	+	—	5	—	+	—	—	
	9	—	+	—	9	—	+	—	—	T 34/2
37° C T.St.	10	—	+	—	9	—	+	—	—	— (+) — —
	12	—	+	—	10	—	+	—	—	— + — —
25° C T.St.	12	—	+	—	12	—	+	—	—	— (+) — —
	13	—	(+)	—	11	—	+	+	+	— + (+) +)
					12	—	+	+	+	— + — +)
					12	—	+	+	+	— + (—) +)
					13	—	(—)	+	+	— + + +)

	Mtn. n.	4b				Mtn. n.	6b			
		In	MR	VP	Cl		In	MR	VP	Cl
37° C M.St.	0	—	+	—	—	0	—	+	+	—
	3	—	+	—	—	3	—	+	+	—
	7	—	+	—	—	7	—	+	+	—
	9	—	(—)	—	—	9	—	+	—	—
37° C T.St.	8	—	(—)	—	—	8	—	+	(+)	—
	9	—	(—)	—	—	9	—	+	—	—
	10	—	+	—	—	10	—	+	—	—
25° C T.St.	10	—	+	+	+	10	—	—	+	—
	11	—	+	+	+	11	—	(—)	+	—

Tabelle 4a.

25°C	Gruppe	Stämme	Gel. Verfl. Beweglichkeit	37°C	Harnstoff Uracil Harnsäure	Mannit Glucose Lactose Saccharose Salicin Dulcitol Inositol Adonitol Glycerin Cellobiose Raffinose Maltose Xylose $\alpha$ -Meth. Inulin	Lackm. Milch	Lackm.Red. Coagul. Säure	Neutr.Red.	H <sub>2</sub> : CO <sub>2</sub>	Bulr. 45°C (Eijkm.) Wachstum Gas od. p <sub>H</sub> Red.	H <sub>2</sub> S-Bildg.
25°C	L	A 1	+	+	—	+	+	S <sup>(+)</sup>	R	3,2:1	—	—
		L 7	+	+	—	+	+	(+) <sup>+</sup>	R	3,6:1	—	—
		H 28	+	+	—	+	—	—	R	3,5:1	R + sgt	—
		Fy	+	+	—	+	—	—	R	2,8:1	R + sgt	—
		2a	+	+	—	+	—	—	R	3:1	R + sgt	—
		Fx/1	—	—	—	—	—	—	—	S	— 5,0 befr	—
		Fx/2	—	—	—	—	—	—	—	S	— 5,0 befr	—
	M	T 33	+	—	—	—	—	(+) <sup>+</sup>	R	4:1	—	+
		T 34/1	—	—	—	—	—	(+) <sup>+</sup>	R	1,8:1	—	+
		T 34/2	—	—	—	—	—	(+) <sup>+</sup>	R	4:1	—	+
		4b	—	—	—	—	—	(+) <sup>+</sup>	R	2:1	—	+
	N	6b	+	—	—	—	—	+	R	2,2:1	—	+
		12a/1	+	—	—	—	—	—	—	5:1	—	—
		12a/2	+	—	—	—	—	—	—	3,3:1	—	—
			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

\* Bei 25°C.



sich temperaturstabil erwiesen hätte, sozusagen zum indolnegativen *Esch. coli*-Typ geworden.

Eine Abwandlung ganz anderer Art ist möglicherweise bei dem indolnegativen *Coli*-Typ Fx (Tab. 4) aufgetreten. Seine beiden Tochterstämme (Tab. 4a) erwiesen sich nämlich als indolpositiv; allerdings trat diese positive Reaktion erst nach 4—6tägiger Bebrütung der zum Indolnachweis dienenden Kulturen auf. Die früheren Versuche waren aber meist schon nach 2—3 Tagen abgeschlossen worden, so daß nicht entschieden werden kann, ob nach 4—6tägiger Versuchsdauer nicht doch auch der Mutterstamm sofort nach seiner Isolierung eine indolpositive Reaktion gegeben hätte oder diese Eigenschaft erst während seiner längeren Weiterzüchtung erworben hat.

Während nun die Stämme A 1—Fx/2 (Tab. 4a) — wie im übrigen auch alle anderen bisher besprochenen Stämme, die keiner Imvic-Abwandlung unterworfen waren — bei 25° C die gleichen MR- und VP-Reaktionen gaben wie bei 37° C, war dies bei den übrigen Stämmen der Tab. 4a, abgesehen von T 33, nicht der Fall, obwohl sie (bei 37° C) ebenfalls ein konstantes Imvic-Verhalten aufwiesen. Mit Ausnahme von T 33, bildeten sie nämlich bei 25° C mehr oder weniger stark Acetoin.

Bei T 34/1, Tab. g, fiel bei 25° C sogar die MR-Probe einmal negativ aus, bei Stamm 6b war sie bei 2 Wiederholungen negativ. Letzterer verhielt sich bei 37° C immer MR-positiv und ursprünglich auch VP-positiv. Seine Fähigkeit, bei 37° C Acetoin zu bilden, verlor er jedoch in der 2. Mutterstamm-Phase, und auch in der Tochterstamm-Phase blieb dieses Verhalten bestehen. Auf Grund dieser Befunde kann man diesen Stamm als citratnegativen, ursprünglich VP-positiven Intermediärtyp auffassen, der die Eigenschaft der Citratverwertung vermutlich schon vor der Isolierung verloren hatte und der im Laufe der Weiterzucht durch den Verlust der Fähigkeit, bei 37° C Acetoin zu bilden, sich dem *Coli*-Typ näherte, andererseits aber seine frühere VP-positive Intermediärform-Natur bei 25° C noch deutlich durch die Umkehr der Vorzeichen für die MR- und VP-Reaktion zeigte. Auch bei Stamm 12a/1 war bei 25° C die VP-Probe noch schwach positiv, und sein Schwester-Stamm 12a/2 vermochte wenigstens noch Spuren von Acetoin zu bilden. Durch diese in vorliegenden Versuchen nun offenbar gewordene Eigenschaft wird die Richtigkeit der in der I. Mitt. vorgenommenen Definition des Ausgangsstammes 12a als ein zwar dem Kaltblütertyp von *Esch. coli* sehr nahestehender, aber noch schwach intermediären Charakter tragender Typ bestätigt.

Bei den *Paracoli*-Stämmen T 33—4b ist außer der Fähigkeit von T 34/1—4b, bei 25° C Acetoin zu bilden, noch als besonders bedeutsam hervorzuheben, daß alle diese bei 37° C citratnegativen Typen bei 25° C Citrat als alleinige C-Quelle verwerten konnten, wenn sie auch gewöhnlich erst am 3.—4. Versuchstage damit begannen. Somit ließen sich also für die Formen in der kleinen Gruppe der hier vorliegenden lactosenegativen *Paracoli*-Typen, bei 25° C getestet, die Imvic-Reaktionskombinationen — + +, — + + + und — + — + bilden; sie sind also alle mehr oder weniger stark der *Aerobacter*-Form zugewandt. Diese Versuche wurden bereits auch bei der in der I. Mitteilung vorgenommenen Klassifizierung dieser Stämme berücksichtigt.

#### D. Die Formenverwandtschaft innerhalb der Coli-Aerogenes-Gruppe.

Überblicken wir nun die bei den verschiedenen Stämmen aufgetretenen Imvic-Abwandlungen in ihrer Gesamtheit, so zeigt sich, daß am häufigsten zwei Abwandlungsarten vorkamen, die eine vom *Aerobacter*-Typ —++ zur Intermediärform —+++ , die andere von dieser Zwischenform zur Intermediärform —+—+ . Oft wurde auch von ein und demselben *Aerobacter*-Typ die Intermediärstufe —+++ bis zum intermediären Typ —+—+ durchschritten. Daraus ist trotz eines gelegentlich auch rückläufigen Abwandlungsvorganges eine allgemeine Abwandlungs-Richtung vom *Aerobacter*-Typ —++ über die Intermediärform —+++ zu einer solchen mit der IRK—+—+ zu erkennen.

Diese Abwandlungstendenz war bei Stämmen sowohl mit wie ohne die Fähigkeit zur Eigenbewegung, Gelatineverflüssigung, Indol- und H<sub>2</sub>S-Bildung zu beobachten, und diese vier Eigenschaften, bzw. deren positive oder negative Eigenschaftswerte, blieben während der ganzen Versuchszeit — für das H<sub>2</sub>S-Bildungsvermögen wurden allerdings erst in der 2. Hälfte der Versuchsperiode Vergleichs-Versuche angestellt — mit verschwindend geringer Ausnahme für die einzelnen Stämme konstant. Infolgedessen läßt sich, wenn wir die bei den Stämmen beobachtete Abwandlungsrichtung in der MR- und VP-Reaktion als gleichlaufend mit dem Entwicklungsverlauf der Formenentwicklung innerhalb der *Coli-Aerogenes*-Gruppe auffassen wollen, ein Formen-Entwicklungsschema in seinen Grundzügen so darstellen, daß wir sämtliche in den Versuchen aufgetretenen Imvic-Typen, der Imvic-Abwandlungsrichtung entsprechend, aber in bezug auf die negativen und positiven Eigenschaftswerte hinsichtlich Eigenbewegung, Gelatineverflüssigung, Indol- und H<sub>2</sub>S-Bildung getrennt, in parallel nebeneinander verlaufende Abwandlungs- bzw. Entwicklungs-Grundlinien anordnen. Außerdem mag noch die N-Quellen-Aktivität als weiteres Kriterium zur Beurteilung der Verwandtschaftsnähe zwischen den einzelnen Typen dienen, da aus den vorliegenden Versuchen hervorgeht, daß, je weiter entfernt in der Imvic-Entwicklungsreihe ein Typ von *Aerobacter* entfernt steht, um so geringer im allgemeinen auch seine N-Quellen-Aktivität ist. Auf diese Weise ergeben sich die in Abb. 1 dargestellten Entwicklungsgrundlinien.

In diesem Schema wurde eine dieser Entwicklungsreihen, von *Aerob. cloacae* herkommend und über bewegliche, Gelatine verflüssigende, indolnegative Zwischenformen führend, als indol-negative „*Cloacae*“-Linie A dargestellt, zwei weitere, von *Aerob. aerogenes* sich ableitend und über unbewegliche, Gelatine nicht verflüssigende, indolnegative Intermediär-Typen gehend, als indolnegative „*Aerogenes*“-Linie D und E. Hiervon ist die Linie D die H<sub>2</sub>S-positive Formenreihe dieser Art, die Linie E die H<sub>2</sub>S-negative. Letztere stellt im übrigen nur den oberen Teilabschnitt einer solchen Linie dar, da sie lediglich durch Formen mit 3-facher N-Quellenverwertung gebildet werden konnte, sich jedoch nicht durch Typen weiterführen ließ, welche in dieser Hinsicht eine geringere Aktivität, z. B.





Der Linienabschnitt C (R 21—H 30) könnte, da er ebenfalls durch indolpositive Formen gebildet wird, die nur Harnstoff oder gar selbst diesen nicht mehr verwerten und die außerdem Gelatine nicht verflüssigen, zur Ergänzung der indolpositiven „*Aerogenes*“ Linie F dienen. Da jedoch die Formen des Linienabschnittes C alle beweglich sind, müßte, wenn man diese Ergänzung vornehmen wollte, die Annahme gemacht werden, daß innerhalb der Linie F ein Übergang zwischen beweglichen und unbeweglichen Formen stattfände. Wenn auch grundsätzlich die Möglichkeit einer solchen Formen-Abwandlung — hinsichtlich der Bewegungsfähigkeit — bestehen mag, so konnte doch während der ganzen Versuchsdauer bei keinem Versuchsstamm ein solcher Wechsel beobachtet werden, weshalb eben eine getrennte Linienführung für bewegliche und unbewegliche Formen angenommen wurde. Da nun die Stämme in Linie C noch außer der Beweglichkeit eine *cloacae*-ähnliche Glycerinverwertung besitzen und — wenngleich in einer indolnegativen Reihe — wenigstens in einem Versuchsfalle eine Abwandlung vom gelatineverflüssigenden zum gelatinenichtverflüssigenden Typ festgestellt werden konnte, wurde diese Reihe, wie bereits schon früher dargelegt, als unterer Abschnitt einer indolpositiven „*Cloacae*“-Linie ohne Gelatine-Verflüssigungsvermögen aufgefaßt, deren Vertreter das Gelatine-Verflüssigungsvermögen — je nach Auffassung hinsichtlich der Entwicklungsrichtung — noch nicht erlangt oder wieder verloren haben.

In Analogie hierzu läßt sich die Linie B als indolnegative „*Cloacae*“-Entwicklungsreihe ohne Gelatine-Verflüssigungsvermögen deuten, denn bei den Typen wenigstens des oberen Abschnittes liegen in bezug auf die Glycerin-Verwertung die gleichen Verhältnisse vor, wie bei den Formen in Reihe C. Die Linie B erfährt außerdem an ihrem oberen Ende über den Stamm 9b, der, wie bereits erwähnt, im Laufe des Versuchsjahres sein Gelatine-Verflüssigungsvermögen verlor und als Abzweigung von der „*Cloacae*“-Linie A zur Linie B herüberreicht, eine Verknüpfung mit der Linie A, deren Formen Gelatine verflüssigen. In ihrem unteren Abschnitt (19a—K 16) wird die Linie B allerdings von beweglichen Stämmen fortgesetzt, die Glycerin unter Gas- und Säurebildung zerlegen und deren Zuteilung zu dieser Reihe deshalb als unsicher anzusehen ist, da sie nur die Beweglichkeit mit *Aerob. cloacae* gemeinsam haben, während sie in ihrem Verhalten gegenüber Gelatine und Glycerin dem *Aerogenes*-Typ gleichen. Man könnte also diese Formen mit dem gleichen Recht auch in eine „*Aerogenes*-Linie“ oder besser noch in eine zwischen den „*Cloacae*“- und „*Aerogenes*-Reihen“ intermediär verlaufende, selbständige Entwicklungsreihe stellen. Andererseits dürfte sich aber in Anbetracht ihrer Beweglichkeit auch die Auffassung vertreten lassen, daß sie — wenn wir eine Entwicklung in aufsteigender, zu *Aerobacter* hinführender Richtung annehmen wollen — als Übergangsformen zu *Aerob. cloacae* anzusehen sind, die eben in ihrer Entwicklung nicht nur hinsichtlich der Gelatine-Verflüssigung, sondern auch hinsichtlich der Glycerin-Verwertung noch besonders nah bei *Esch. coli*, bzw., wie später aufgezeigt werden soll, bei *Paracoli* stehen. Mit entsprechendem Vorbehalt wurden sie daher in die indolnegative „*Cloacae*“-Entwicklungsreihe B ohne Gelatine-Verflüssigungsvermögen gestellt.

Inwieweit sind nun die in den Versuchen beobachteten Abwandlungen dem natürlichen Entwicklungs-Geschehen gleichzusetzen? Die Meinungen, wie man sich den Vorgang der Evolution innerhalb der *Enterobacteriaceae* vorzustellen hat, sind nicht einheitlich.

BORMAN und Mitarbeiter (1944) z. B. glauben, eine Entwicklung in absteigender Linie annehmen zu müssen, die von *Aerobacter* über *Paracoli* zur *Salmonella-Shigella*-Gruppe führt, da bei den Formen innerhalb der Familie der *Entero-*

*bacteriaceae* offensichtlich eine allgemeine Entwicklungstendenz von der saprophytischen zur kommensalen bzw. parasitischen Lebensweise festzustellen sei. PARR (1933) dagegen vertritt die Ansicht, daß die Entwicklung von den *Paracoli*-Bakterien aus in der einen Richtung über *Esch. coli* zu den citratpositiven Intermediärformen und von hier zu *Aerobacter* führt, in der anderen Richtung zur *Salmonella-Shigella*-Gruppe.

Dieser letzterwähnten Auffassung würde nun, was die Formen-Entwicklung innerhalb der *Coli-Aerogenes*-Gruppe anbelangt, die in den Versuchen beobachtete, von *Aerobacter* zu den Intermediärformen führende Abwandlungsrichtung nicht entsprechen, da sie ja zu der von PARR angenommenen, zu *Aerobacter* hinführenden Entwicklungsrichtung gerade entgegengesetzt gerichtet verläuft. Jedoch dürfen wir bei der Beurteilung der hier vorliegenden Ergebnisse nicht außer acht lassen, daß die Ernährungs- und Temperaturbedingungen der Versuchsstämme während ihrer kulturellen Weiterzüchtung gegenüber den in mannigfacher Verschiedenheit durch die Natur gebotenen Verhältnissen so einseitig veränderte, degenerativ wirkende Umwelteinflüsse darstellen, daß sie wohl gerade für das Rückläufigwerden eines Stammes in seiner natürlichen Evolution in besonderem Maße die Voraussetzung gegeben haben dürften. Man darf wohl annehmen, daß unter den künstlichen Züchtungsbedingungen eine im Laufe der natürlichen Entwicklung von einem Stamm neu erworbene Eigenschaft, wie z. B. das Acetoinbildungsvermögen, in degenerativer Rückentwicklung besonders leicht wieder verloren gehen konnte (von  $++++$  zu  $-+-+$ ), bzw. daß analog hierzu, ein während der natürlichen Evolution aufgetretener Verlust einer ursprünglichen Eigenschaft, z. B. der Fähigkeit zur gesteigerten Säurebildung, leicht wieder rückgängig werden konnte (von  $---++$  zu  $-++++$ ). Demzufolge dürfte die Tatsache, daß in den vorliegenden Versuchen die Abwandlungen der Stämme in absteigender Richtung von *Aerobacter* her zu den Intermediärformen hin verliefen, der von PARR (l. c.) vertretenen Ansicht nicht entgegenstehen, da die bei den Stämmen aufgetretenen Abwandlungen — wenigstens zum großen Teil — nicht anders zu deuten sind, als daß sie zur ursprünglichen Evolutionsrichtung rückläufig verlaufene Degenerationsabwandlungen darstellen, aus deren Verlaufsrichtung hervorgeht, daß man sich die natürliche Formen-Entwicklung innerhalb der *Coli-Aerogenes*-Gruppe offenbar zu *Aerobacter* hin aufsteigend vorzustellen hat.

Neben solchen, zur ursprünglichen Entwicklung gegenläufig gerichteten Abwandlungen konnten natürlich auch andersgerichtete Abwandlungen bei den Stämmen aufgetreten sein, z. B. die Abwandlung VP-negativer Intermediärformen von positivem zu negativem Verhalten in der MR-Probe (z. B.  $++-+$  zu  $-----+$ ). Diese Abwandlung kam nämlich nicht so zustande, daß etwa diese Formen infolge des Verlustes ihrer Fähigkeit zur gesteigerten Säurebildung „rückläufig“ geworden

wären, sondern durch Neuerwerb einer anderen Fähigkeit, mit Hilfe derer sie die von ihnen gebildete Säure wieder frühzeitig abbauen konnten, so daß die MR-Probe, am üblichen Tage ihrer Vornahme, negativ ausfiel, wodurch bei diesen Formen ein Verlust ihres gesteigerten Säure-Bildungsvermögens und damit eine Rückläufigkeit in ihrer Entwicklung vorgetäuscht wurde. Solche Abwandlungen sind natürlich zur ursprünglichen Entwicklungsrichtung nicht gegenläufig gerichtet, sondern zweigen von ihr ab und wurden in dem Schema Abb. 1 als seitlich gerichtete Abzweigungen an den Grundlinien dargestellt.

Was nun die Reihenfolge anbelangt, in der die hauptsächlichsten Formtypen der *Coli-Aerogenes*-Gruppe die Entwicklungsreihen zwischen *Paracoli* und *Aerobacter* aufbauen, so wird im allgemeinen, wie auch von PARR, angenommen, daß die citratpositiven Intermediärtypen als Zwischenformen zwischen *Aerobacter* und *Esch. coli* aufzufassen sind, die ihrerseits an *Paracoli* anschließen.

Diese Auffassung vom Verwandtschaftsgefüge innerhalb der coliformen Gruppe findet in folgendem ihre Begründung: Der Anschluß zwischen den lactosenegativen *Paracoli*-Formen und der lactosepositiven Art *Esch. coli* läßt sich durch die lactosemutablen Typen von *Esch. coli* vermittelt denken. Die citratpositiven Zwischenformen sind als Bindeglieder zwischen *Esch. coli* und *Aerobacter* gedacht, weil sie MR-positiv und VP-negativ sind und darin mit der citratnegativen Art *Esch. coli* übereinstimmen, andererseits aber bereits die positive Citrat-Verwertung und teilweise auch die Acetoin-Bildungsfähigkeit mit der Gattung *Aerobacter* gemeinsam haben und dadurch mit dieser in näherer Beziehung stehen.

In den vorliegenden Versuchen wurden nun einige *Paracoli*-Bakterien isoliert, von denen aus an die citratpositiven Zwischenformen sich mindestens so gut ein Anschluß ermöglichen läßt, wie von *Esch. coli* aus. Diese *Paracoli*-Stämme (T 33—4b, Tab. 4a) geben nämlich bei 37° C eine negative, bei 25° C eine positive Citratreaktion. Bei ihnen ist also die Fähigkeit der Citratausnützung an sich schon vorhanden, nur scheint sie labil, dafür aber um so leichter „modifizierbar“ zu sein. Bei einer direkten Entwicklung von citratpositiven Intermediärtypen aus solchen *Paracoli*-Formen wäre also zur Erreichung der citratpositiven Intermediärform-Stufe kein Totalerwerb der Fähigkeit, Citrat zu verwerten, nötig. Dies wäre der Fall, wenn *Esch. coli* als Bindeglied zwischen *Paracoli* und den citratpositiven Zwischenformen stünde und wenn somit von ihr aus die Weiterentwicklung zu letzteren stattfände. Bei solchen *Paracoli*-Formen brauchte dagegen — etwa nur nach Art einer „Dauer-Modifikation“ — lediglich eine „Temperatur-Stabilisierung“ ihrer an sich schon vorhandenen, aber „temperatur-labilen“ Fähigkeit zur Citratverwertung zu erfolgen, und so wäre der auch bei 37° C citratpositive und VP-negative Intermediärtyp ( $\pm + - +$ ) vervollständigt. Hierbei müßte natürlich, wie in jedem Falle beim Übergang einer *Paracoli*-Form zu einer Form aus der *Coli-Aerogenes*-Gruppe, auch die



Lactose-Vergärung hinzuerworben werden. Die citratpositiven „langsamen Lactose-Vergärer“ mögen als solche Übergangsformen angesehen werden.

Ist die *Paracoli*-Form, von der die Entwicklung ausgeht, nicht nur citrat-, sondern überdies auch VP-labil, d. h. bildet sie zwar bei 25° C, nicht aber bei 37° C Acetoin, wie das z. B. bei T 34 und 4b der Fall ist, so wäre von einem solchen Typ aus sogar eine Entwicklung direkt zu citrat- und VP-positiven Intermediärtypen möglich, wobei auch die Fähigkeit zur Acetoinbildung nur „temperaturbeständig“ stabilisiert zu werden brauchte. Daß von *Paracoli*-Formen aus mit labiler Fähigkeit zur Acetoinbildung der Entwicklungsverlauf zuerst über *Esch. coli* geht, dürfte recht unwahrscheinlich sein; denn es müßte sich zur Erreichung der *Esch. coli*-Stufe die VP-Labilität dieser *Paracoli*-Formen zunächst negativ stabilisieren und dann zur Erreichung der VP-positiven Intermediärform-Stufe von *Esch. coli* aus die Fähigkeit zur Acetoinbildung zurückgewonnen werden.

Die Entwicklung von *Esch. coli* aus diesen citratlabilen *Paracoli*-Formen könnte man sich auf ähnliche einfache Weise erklären, wie die Entwicklung der citratpositiven Zwischenformen aus diesen Typen; nur würde in diesem Falle die labile Eigenschaft, Citrat zu nützen, sich eben nach der gegenteiligen Seite hin potenzieren und zur temperatur-stabilen „negativen“ „Dauer-Modifikation“ werden, so, daß also nicht nur bei 37° C, sondern auch bei 25° C keine Citrat-Verwertung mehr stattfände.

In beiderlei Richtung, sowohl zu den Intermediärformen wie zu *Esch. coli* hin, könnten natürlich Übergangsformen vermitteln, indem etwa sowohl bei 25° C wie bei 37° C citratpositive und noch lactosenegative *Paracoli*-Typen zu den Intermediärformen, und sowohl bei 37° C wie bei 25° C citratnegative und noch lactosenegative *Paracoli*-Typen zu *Esch. coli* überleiten.

Noch eine andere, aus den Versuchsergebnissen hervorgehende Tatsache kann meines Erachtens zu der Annahme einer getrennt verlaufenden Entwicklung von citratpositiven Intermediärformen und *Esch. coli* aus *Paracolobacterium* führen. Nach den Untersuchungen von MITCHELL und LEVINE (1938) verwerten *Esch. coli*-Formen in der Regel nur Uracil, nicht aber Harnstoff oder Harnsäure als alleinige N-Quelle. Wenn wir nun annehmen wollten, daß *Esch. coli* zwischen *Paracoli* und den citratpositiven Intermediärformen ein Glied in der aufsteigenden Reihe zu *Aerobacter* darstellt, so müßte sich hinsichtlich des Erwerbs der N-Quellenverwertung die Formenentwicklung von *Paracoli* zu *Aerobacter* (Tab. 4a—1a bzw. Abb. 1) folgendermaßen vollziehen:

Von den gegenüber allen 3 N-Quellen sich negativ verhaltenden *Paracoli*-Bakterien aus würde die Entwicklung so verlaufen, daß nach dem Erwerb der Lactosevergärung die Uracil-Verwertung vor der Harnstoff- und Harnsäure-Ausnützung erworben wird, womit die *Esch. coli*-Stufe erreicht wäre. Im weiteren Verlauf der Entwicklung zu den citratpositiven Zwischenformen müßte dann die Uracil-Verwertung vor bzw. mit der Erlangung der Harnstoff-Verwertung wieder

verlorengehen, da die zutiefst in der aufsteigenden Entwicklungsreihe zu *Aerobacter* stehenden VP-negativen Zwischenformen kein Uracil, sondern nur Harnstoff verwerten. Bei der Weiterentwicklung der VP-negativen Zwischenformen über die VP-positiven Intermediärtypen zu *Aerobacter* müßte dann aber die Uracil-Verwertung wieder zurückgewonnen werden, da sowohl die VP-positiven Intermediärformen, wie auch *Aerobacter*, uracilpositiv sind.

Auch in diesem Falle würde ein immerhin recht umständlicher Entwicklungsvorgang vorliegen, der sich wesentlich einfacher gestalten würde und entsprechend wahrscheinlicher schiene, wenn von den *Paracoli*-Formen aus die Entwicklung der citratpositiven Intermediärtypen nicht über *Esch. coli*, sondern auf direktem Wege sich vollziehen würde; es müßte dann die Erreichung der 3fachen N-Quellen-Aktivität (Harnstoff, Uracil, Harnsäure) der *Aerobacter*-Formen nicht über solche Umwege erfolgen, sondern sie könnte in steter Addierung der drei Eigenschaften in der aufgezeigten Reihenfolge ohne Verlust und Wiedergewinnung der Uracilverwertung vor sich gehen.

Von den *Coli*-Stämmen A 1 und L 7 aus könnte allerdings die Weiterentwicklung zum citratpositiven Zwischenform-Typus erfolgen, ohne daß zuvor die Fähigkeit zur Uracil-Verwertung verloren und die Harnstoff-Verwertung erworben werden müßte, denn diese beiden *Coli*-Formen sind nicht uracil-, sondern harnstoffpositiv. Man könnte sich demzufolge ihre Eingliederung zwischen *Paracoli* und citratpositiven Intermediärtypen, die man sich, wie R 21—R 18 (Abb. 1), beweglich und indolpositiv, aber abweichend von diesen  $H_2S$ -negativ und glycerinpositiv vorzustellen hat, ohne weiteres denken, wobei sie im übrigen sogar aus einer bereits schon citratnegativen *Paracoli*-Form entstanden sein könnten. Im Falle ihrer Weiterentwicklung zu den citratpositiven Intermediärtypen wäre dann hinsichtlich der Erlangung der Fähigkeit, Citrat zu nützen, allerdings ein Totalerwerb nötig, während bei einer direkten Ableitung dieser Intermediärtypen von citratlabilen *Paracoli*-Formen nur eine „Temperatur-Stabilisierung“ erfolgen müßte.

Aus diesem Grunde wurden auch die beiden *Coli*-Formen, A 1 und L 7, nicht als Bindeglieder zwischen *Paracoli* und den citratpositiven Zwischenformen aufgefaßt, zumal noch eine andere Möglichkeit ihrer Ableitung sich über die Besprechung jener „irregulären“ Formen und Abwandlungstypen ergibt, die auf Grund ihrer gewöhnlich „irregulären“ N-Quellen- oder Imvic-Konfiguration nicht in die von *Paracoli* zu *Aerobacter* führenden Entwicklungs-Grundlinien selbst eingeordnet werden konnten und daher in Entwicklungs-Seitenlinien Aufnahme finden mußten. Aus dem Schema in Abb. 1 kann man sich ohne besondere Erläuterungen ein Bild davon machen, aus welchen Grundtypen man sich diese in den Seitenlinien angeordneten „irregulären“ Formen herleiten kann, bzw. aus welchen Versuchs-Stämmen sie sich jeweils abwandelten. Es sollen daher nur einige Einzelheiten besprochen werden.

Bei einigen Intermediärformen entstanden während ihrer Züchtung Abwandlungstypen mit „irregulärer“ Imvic-Konfiguration, die sich folgendermaßen charakterisieren lassen: Erwarb eine citratpositive Intermediärform nach vorausgegangener Einbuße des Acetoinbildungsvermögens die Fähigkeit zum Wiederabbau der durch den Stoffwechsel gebildeten Säureprodukte (was sich als Verlust

des positiven Verhaltens in der MR-Probe auswirkt), so entstanden Typen mit den „irregulären“ Imvic-Konfigurationen — — — + bzw. + — — —. Beispiele solcher Vorgänge sind aus Abb. 1 (Linie B, C, D) ersichtlich. Bei den beiden Tochter-Stämmen von 8a erfolgte zudem noch ein zeitweiliger Verlust der Fähigkeit, Citrat zu verwerten, wodurch die Entstehung eines „irregulären“ Imvic-Typs — — — — wenigstens angedeutet war. Analog hierzu könnte man sich die Bildung einer Abwandlungsform + — — — aus einem indolpositiven Intermediärtyp vorstellen.

Diese Abwandlungsvorgänge könnten möglicherweise dem Ablauf einer natürlichen Entwicklung entsprechen, welche zur Bildung von solchen „irregulären“ Imvic-Formen mit naturgegebenem Vorkommen geführt hat. Auf Grund einer solchen Vorstellung wären also solche „irregulären“ Typen als reduzierte Formen der verschiedenen, zwischen *Paracoli* und *Aerobacter* möglichen Entwicklungsstufen aufzufassen.

Außer der Tendenz, zu diesen „irregulären“ Imvic-Typen abzuwandeln, zeigten einige citratpositive Zwischenformen auch noch eine Neigung, sich zu „coligleichen“ Imvic-Formen umzubilden. Dies offenbarte sich in der Tendenz zum Verlust der Fähigkeit, bei 37° C Acetoin zu bilden und Citrat zu verwerten, während das positive Verhalten bei der MR-Probe erhalten blieb.

Solche Abwandlungserscheinungen führten bei den Tochter-Stämmen von 8a und R19 zu coligleichen Reaktionskombinationen — + — — (8a/1 u. 2(α) und R19/1 u. 2(α), Abb. 1, Linie B u. E), die allerdings, vor allem bei 8a/1 u. 2(α) nicht konstant waren. Immerhin ist hierdurch die Möglichkeit einer Umbildung dieser citratpositiven Zwischenformen zu coligleichen Imvic-Typen aufgezeigt. Diese Abwandlungstypen unterscheiden sich aber durch ihre abweichende N-Quellen-Aktivität vom typischen *Esch. coli*, das normalerweise nur Uracil verwertet, während 8a/1 u. 2(α) außer Uracil auch noch Harnstoff und R19/1 u. 2(α) außer (Uracil) noch Harnsäure verwenden konnten. Auf diese Besonderheiten wird noch zurückgekommen werden.

Stamm 12a zeigte während der ganzen Versuchszeit bei 37° C konstant nur eine coligleiche Imvic-Kombination (Tab. 4 u. 4a) und selbst in den 25° C-Versuchen, die am Ende der etwa 1 jährigen Züchtungsperiode vorgenommen wurden, war bei dem einen seiner beiden Tochter-Stämme die Fähigkeit zur Acetoinbildung nur sehr beschränkt vorhanden, beim andern praktisch sogar überhaupt kaum feststellbar. Die Entstehung dieses Stammes 12a könnte man, wie schon in der I. Mittlg. begründet, abgesehen davon, daß sein Ursprung auf eine bewegliche *Paracoli*-Form zurückgehen mag, gewissermaßen auf eine Fortsetzung der Abwandlungen, welche R19 erfährt, zurückführen. Er hätte also — nach Abzweigung etwa von einer *cloacae*verwandten Intermediärform (Abb. 1, B) die bei R19/1 u. 2 (Tab. 2a) noch variabel vorhandene, bzw. von denselben noch nicht ganz verlorene Fähigkeit zur Acetoin-Bildung und Uracil-Verwertung — bis auf das Relikt eines minimalen Acetoin-Bildungsvermögens bei 25° C — endgültig verloren. Erhalten geblieben wäre dagegen — wie bei R19/1 u. 2 — die Fähigkeit zur verstärkten Säurebildung und zur Harnsäure-Verwertung. Seiner Imvic-Kombination nach ist er als indol-negative *Esch. coli*-Form zu bewerten, für die jedoch seine positive Harnsäure-Verwertung atypisch ist.

Die Abwandlung des Stammes 6b ist der des Stammes R19 ebenfalls ähnlich, aber etwas abweichend. Stamm 6b war unmittelbar nach seiner Isolierung bei 37° C und 25° C citratnegativ, aber VP-positiv, und mag daher in Analogie zu R19 als



ein Intermediärtyp aufgefaßt werden, der von *Paracoli* bereits vor seiner Isolierung aufsteigend, nachdem er die Lactosevergärung erworben und die Fähigkeit Acetoin zu bilden, stabilisiert hatte, die Fähigkeit der Citratausnützung verlor und damit rückläufig wurde (Abb. 1, B). Schließlich erfuhr während der Züchtungsperiode auch wieder sein Acetoin-Bildungsvermögen eine Beschränkung, indem er am Schluß der Untersuchungen bei 37° C Acetoin nicht mehr zu bilden vermochte, sondern nur mehr bei 25° C, so daß sich für ihn — bei der im allgemeinen üblichen Testierungstemperatur von 37° C — während der zweiten Versuchsperiode konstant die *coligleiche* Imvic-Kombination — + — — ergab. Daß dieser Stamm, bzw. sein *coli*ähnlicher Abwandlungstyp, keine vom typischen *Esch. coli* abweichende N-Quellen-Aktivität (Harnstoff- oder Harnsäure-Verwertung) aufwies, ist mit seiner offenbar frühen Rückläufigkeit auf dem Wege seiner Entwicklung zu *Aerobacter* zu erklären, die allem Anschein nach schon so vorzeitig einsetzte, daß er nicht einmal die Harnstoff-Verwertung erworben hatte, bevor er sich — in Kultur genommen — durch den Verlust der Fähigkeit, bei 37° C Acetoin zu bilden, dem *Coli*-Typ näherte. So zeigte also dieser Abwandlungstyp, der weder Harnsäure noch Uracil noch Harnstoff verwertete, keine vom typischen *Esch. coli* abweichende N-Quellen-Aktivität, denn das Fehlen der Fähigkeit zur Uracil-Verwertung allein kann, wie die Warmblüter-Stämme 2a, Fx und Fy bezeugen, für dieses nicht als atypisch bezeichnet werden.

Alle diese dem *Coli*-Typ mehr oder weniger genäherten Abwandlungen der Stämme 8a, R 19 und 6b sowie der bei 37° C konstant *coligleiche* Imvic-Typ 12a zeigten einen zumeist sehr ausgeprägten „Kaltstamm“-Charakter und gaben demgemäß auch eine negative EIJKMAN-Probe. Diese Eigenschaft kam aber auch den Stämmen A 1 und L 7 zu, die sich dadurch vom Warmblütertyp unterschieden und dementsprechend als Kaltblüter-*Coli* eingestuft wurden.

Dies legt die Vermutung nahe, daß es sich bei den Stämmen A 1 und L 7 und möglicherweise überhaupt bei den Kaltblüter-*Coli*-Typen um Formen handeln könnte, für die eine den vorher aufgezeigten Abwandlungen entsprechende Abstammung von zwischen *Paracoli* und *Aerobacter* stehenden Intermediärformen anzunehmen ist, zumal auch A 1 und L 7 eine für normale *Esch. coli*-Formen atypische N-Quellen-Aktivität (Harnstoff-Verwertung) aufweisen, die sich ohne weiteres mit der Annahme erklären läßt, daß diese Stämme von Intermediärformen zwischen *Paracoli* und *Aerobacter* abstammen, welche die Fähigkeit zur Harnstoffverwertung besaßen.

Danach würden also, während die Warmblüter-*Coli*-Typen direkt von *Paracoli* abzuleiten wären, die Kaltblüter-*Coli*-Typen von Intermediärformen zwischen *Paracoli* und *Aerobacter* abstammen und durch den Verlust der Citrat-Verwertung reduzierte Formen sein, die, außer dem negativen Verhalten in der EIJKMAN-Probe, häufig noch eine vom Warmblüter-*Coli* abweichende irreguläre N-Quellen-Verwertung besitzen, indem sie nicht nur Uracil, sondern auch Harnsäure oder Harnstoff als alleinige N-Quelle verwerten können. Ein solches Verhalten bezüglich der N-Quellen-Verwertung stellt allerdings keine durchgängige Regel dar,

was auch gar nicht erwartet werden darf; denn wenn die Reduktion schon sehr frühzeitig bei einer Zwischenform an der Basis eines zu *Aerobacter* aufsteigenden Astes einsetzt, bevor die Verwertung einer der 3 N-Quellen erworben wurde, müssen Formen entstehen, die, wie der *coligenäherte* Abwandlungstyp 6b, keine der 3 N-Quellen angreifen. Diese gleichen natürlich Warmblüter-Formen, die als Bindeglieder in dem direkt von *Paracoli* abzweigenden Ast zum uracilpositiven *Coli*-Warmblüter-Typ die Uracil-Verwertung noch nicht erlangt haben und daher sich ebenfalls gegenüber allen 3 N-Quellen negativ verhalten, wie das bei 2a und den beiden Fäkal-Stämmen Fx und Fy der Fall ist.

#### E. Zusammengefaßte Darlegung über das Verwandtschafts-Gefüge der *Coli-Aerogenes*-Gruppe.

Die hier entwickelte Ansicht über die Formen-Verwandtschaft innerhalb der *Coli-Aerogenes*-Gruppe läßt sich durch folgende Grundzüge kennzeichnen:

Als gemeinsamer naher Ursprung der *Coli-Aerogenes*-Bakterien wird die *Paracoli*-Gruppe angesehen, aus der sich Formen, nicht auf dem Umweg über *Esch. coli*, sondern unter Stabilisierung ihrer labilen Fähigkeit, Citrat zu verwerten, und durch Erwerb der Lactose-Vergärung direkt zu den citrat- und MR-positiven, gewöhnlich zuerst VP-negativen, schließlich aber VP-positiven Zwischenformen entwickeln, die zu den Formen der Gattung *Aerobacter*, mit negativer MR-Probe, überleiten. Damit verknüpft ist der jeweils auf verschiedenen Entwicklungsstufen erfolgende Erwerb der Harnstoff-, Uracil- und Harnsäure-Verwertung in vorstehender Reihenfolge, so daß also eine durch den Erwerb nur der Harnstoff-Verwertung gekennzeichnete Entwicklungsform im allgemeinen mit *Paracolobactrum* näher verwandt ist als mit *Aerobacter*. Diese Entwicklungsvorgänge verlaufen in zwei Gruppen, deren eine über bewegliche Formen zu *Aerobacter cloacae*, deren andere über unbewegliche Formen zu *Aerobacter aerogenes* aufsteigt. Beide Gruppen gliedern sich in indolpositive und indolnegative Formenreihen, und diese vermutlich wiederum in H<sub>2</sub>S-positive und H<sub>2</sub>S-negative Linien. Die zu *Aerobacter cloacae* führende, bewegliche Gruppe erfährt überdies eine weitere Differenzierung in Gelatine verflüssigende und nichtverflüssigende Abstammungslinien, deren verschiedene Entwicklungsstufen in beiden Linien gewöhnlich bis weit zum Ursprung zurück durch eine *cloacaetypische* Glycerinverwertung gekennzeichnet sind.

Die Aufgliederung in diese Entwicklungsreihen mag auf der verhältnismäßig weniger leicht möglichen Umformbarkeit der die einzelnen Reihen jeweils charakterisierenden Eigenschaften, wie Beweglichkeit, Indolbildung usw. (Abb. 1) beruhen, die vermutlich bereits bei den Stammformen mit positivem oder negativem Eigenschaftswert vorgebildet sind

und sich im Verlaufe der Weiterentwicklung als verhältnismäßig konstant erweisen. Dabei mag gelegentlich durch Verlust oder Erwerb solcher Eigenschaften (z. B. auch des Gelatine-Verflüssigungsvermögens) auf irgendeiner Entwicklungsstufe ein Überspringen von Formen aus einer Abstammungslinie in eine andere vorkommen.

An diesen Entwicklungs-Grundlinien entstehen sekundäre Abzweigungen, die auf gegenläufigen — z. B. im Falle des Verlustes der Citrat-Verwertung — oder zur ursprünglichen Entwicklungsrichtung irgendwie anders gerichteten, irregulär verlaufenden Abwandlungen von Formen verschiedener Entwicklungsstufen beruhen. Auf diese Weise könnte man sich die „irregulären“ Formen der *Coli-Aerogenes*-Gruppe entstanden denken. Möglicherweise sind auch die Kaltblüter-*Coli*-Typen, die vermutlich häufig eine vom Normaltyp des Warmblüter-*Coli* abweichende N-Quellenverwertung besitzen dürften, durch Reduktion aus Zwischenformen hervorgegangen, deren Fähigkeit, Citrat zu verwerten, verloren ging.

Schließlich leiten sich in direkter Linie von den *Paracoli*-Bakterien noch als dritte Hauptgruppe die Warmblüter-*Coli*-Typen ab. Diese stellen eine Formengruppe dar, die im Vergleich zu den beiden anderen hinsichtlich Lactose-Vergärung durch gleichsinnige, aber hinsichtlich Carbohydrat-Stoffwechselsteuerung und Citrat-Verwertung durch entgegengesetzt gerichtete Entwicklungsvorgänge entstanden sind; ihre Endglieder haben offenbar nur die Fähigkeit erlangt, von den 3 geprüften N-Quellen Uracil zu verwenden. Diese Formengruppe scheint vornehmlich in beweglichen Stammformen ihren Ursprung zu haben, die entweder indolpositiv oder indolnegativ potenziert sind.

### Zusammenfassung.

Eine größere Anzahl Versuchsstämme von aus nieder- und mittelprozentigem Bier isolierten Bakterien der *Coli-Aerogenes*-Gruppe verhielt sich bei wiederholten Testierungen während eines längeren Zeitabschnitts hinsichtlich der MR- und VP-Probe nicht konstant.

Dies Verhalten war auf Abwandlungsvorgänge während der kulturellen Züchtung der Stämme zurückzuführen; unter den gegebenen Züchtungsbedingungen herrschte besonders die Tendenz vor, vom Imvic-Typ — — — + über die Intermediärstufe — + + + zum Intermediärtyp — + — + überzuwechseln.

Diese Abwandlungen werden als zur ursprünglichen Formen-Entwicklung gegenläufig verlaufene Degenerationsabwandlungen gedeutet, woraus sich für den Verfasser die Auffassung ergab, daß der natürliche Entwicklungsverlauf innerhalb der *Coli-Aerogenes*-Gruppe nicht von *Aerobacter* zu den *Paracoli*-Formen, sondern in entgegengesetzter Richtung führt.



Unter Berücksichtigung verschiedener Versuchs- und Abwandlungsergebnisse wird die Ansicht entwickelt, daß als gemeinsamer Ursprung der *Coli-Aerogenes*-Bakterien die *Paracoli*-Gruppe anzusehen ist, aus der zwei Gruppen von Entwicklungsreihen, nicht auf dem Umweg über *Esch. coli*, sondern direkt über die citratpositiven Zwischenformen, zu *Aerob. cloacae* bzw. zu *Aerob. aerogenes* aufsteigen, während eine dritte, citratnegative Gruppe zu *Esch. coli*, und zwar zu den Warmblüter-Typen dieser Art mit uracilpositivem Verhalten, führt.

Zur Richtung der beiden erstgenannten Hauptentwicklungsgruppen irregulär verlaufende Entwicklungsvorgänge dürften von verschiedenen Entwicklungsstufen aus zu „irregulären“ Formen führen, z. B. von der VP-negativen Intermediärform-Stufe aus zu solchen mit der Imvic-Konfiguration — — — + bzw. + — — + (durch Erwerb der Fähigkeit zum Säure-Wiederabbau), oder zu coligleichen Imvic-Typen — + — — bzw. + + — — (durch Verlust der Fähigkeit, Citrat zu verwerten). Als auf letztere Art entstandene Formen mögen die Kaltblüter-*Coli*-Typen aufgefaßt werden, die sich jeweils von in aufsteigender Entwicklung zu *Aerobacter* begriffenen und mit entsprechender N-Quellen-Aktivität (harnstoffpositiv oder gar schon harnsäurepositiv) ausgestatteten intermediären Entwicklungsformen abgezweigt haben dürften.

### Literatur.

- BERGEY: Manual of Determinative Bacteriology, 6. Ed. Baltimore: Williams and Wilkins 1948. — BORMAN, E. K., C. A. STUART a. WHEELER: J. Bacter. **48**, 357 (1944). — MITCHELL, N. B., a. M. LEVINE: J. Bacter. **36**, 587 (1938). — ORNSTEIN, O.: Z. Immun.forschg. **107**, 70 (1950). Ref. in: Ber. Biol. **71**, 214 (1951). — PARR, L. W.: Bacteriol. Reviews **3**, 1 (1939). — RUCHHOFT, C. C., J. G. KALLAS, B. CHINN a. E. W. COULTER: J. Bacter. **21**, 407 (1931); **22**, 125 (1931). — STUART, C. A., A. M. GRIFFIN a. M. E. BAKER: J. Bacter. **36**, 391 (1938). — UHL, A. Diese Z. **17**, 97 (1952). — WERKMAN, C. H., a. G. F. GILLEN: J. Bacter. **23**, 167 (1932).

(Aus der Bundesanstalt für Pflanzenschutz in Wien.)

## Die Wattehaube. Ein Verschluß für Kulturgefäße zur Züchtung streng aerober Mikroorganismen.

Von

ALEXANDER JANKE

(unter technischer Mitwirkung von HEDWIG ROTH).

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 23. Januar 1952.)

### 1. Wattepfropf- und Kappenverschlüsse.

Vielfältige Erfahrung hat gelehrt, daß der übliche Wattepfropfen-Verschluß der Kulturgefäße — vor allem in der submersen Schüttelkultur — keine ausreichende Luftversorgung für streng aerobe Mikroben gestattet. Dieser Umstand hat sich bereits in den Anfängen der Penicillin-Produktion unangenehm bemerkbar gemacht und tritt auch bei der Gewinnung anderer Antibiotika sowie ganz allgemein bei Züchtung extrem luftliebender Organismen in Erscheinung. Zudem haftet dem Wattepfropfen-Verschluß der weitere erhebliche Nachteil an, daß sich keimhaltige Staubteilchen an seiner rauhen Oberfläche sowie in der Rinne zwischen Pfropfen und Glaswand absetzen und leicht zu Infektionen Anlaß geben, vor allem dann, wenn man aus Gründen der Watteersparung ein Abflammen der Pfropfen vor deren Lüftung unterläßt.

Den letztgenannten Nachteil trachtet man schon seit geraumer Zeit durch Verwendung von Kappenverschlüssen auszuschalten. So hat sich für Kulturröhrchen die Kapsenberg-Kappe (KAPSENBERG 1941) und für weithalsige Glasgefäße die Glaskappe nach KNÖLL (1942) bewährt; zumindest gestatten diese Verschlußarten bei Aufbewahrung der Kulturgefäße in senkrechter Lage in einem Raum, der keine zu starke Luftbewegung aufweist, einen zufriedenstellenden Grad von Infektionssicherheit. Jedoch ist die Luftversorgung im Innern der Kulturgefäße noch wesentlich ungünstiger als bei Verwendung von Wattepfropfen.

Aus diesem Grunde hat KNÖLL (1947) seine Glaskappe für diesen Zweck derart umgestaltet, daß nur die Seitenwand der Kappe aus Glas aufgebaut ist, während der Kopfboden aus einer entsprechend dicken Watte- oder Zellstofflage besteht. Diese abgeänderte Glaskappe hat KNÖLL als Wattekappe bezeichnet. Dieselbe gestattet eine wesentlich bessere Luftversorgung als der gewöhnliche Wattepfropf, weist jedoch den Nachteil auf, daß bei ihrer Verwendung bei Schüttelkulturen — vor allem am Kreisschwingschüttler — eine besondere Kappenklemme nötig ist, da sonst eine Zertrümmerung des Glasteils der Kappe eintreten würde.

## 2. Der Wattehauben-Verschuß.

Verfasser verwendet seit geraumer Zeit bei Kulturversuchen am Kreisschwingschüttler eine Haube, die nur aus Watte besteht, also keine zerbrechlichen Teile aufweist; vgl. hierzu Abb. 1. Es wird eine Wattelage, die zwecks mechanischer Festigung und Herabminderung der Entflammbarkeit beiderseits von Verbandmull umgeben ist, über die Öffnung des mit einem Bördelrand versehenen weithalsigen Kulturgefäßes gelegt

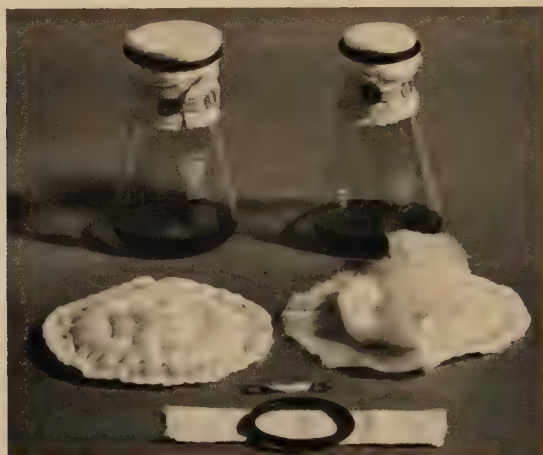


Abb. 1. ERLLENMEYER-Kulturkolben mit Wattehaubenverschluß. *Im Hintergrund:* Fertig montierte 200 ml-Kolben; links Wirag-Weithals-, rechts Jenaer-Kolben. *Im Mittelgrund:* Watte-Mull-Lagen; links: zusammengeheftet; rechts: obere Mullscheibe gehoben, so daß die Wattelage sichtbar ist. *Im Vordergrund:* Gummiring, elastischer Streifen und Verbandklammer.

und mittels eines kräftigen Gummiringes an den Hals desselben angepreßt. Um eine Verschiebung und Zerrung der Watte zwischen den Mullscheiben hintanzuhalten, werden die letzteren mit der Wattelage durch einige Stiche mittels Zwirns zusammengeheftet und zwar möglichst so weit gegen den Rand zu, daß die Heftung nicht mehr über der Öffnung des Kolbens, sondern am Hals desselben zu liegen kommt. Diese im Interesse der Keimsicherheit der Haube geübte Vorsicht hat sich freilich in der Praxis als nicht unbedingt nötig erwiesen.

Wattelage und Mullstücke werden kreisrund geschnitten und zwar weisen die letzteren einen etwas größeren Durchmesser als die erstere auf und sind am Rand eingesäumt, um ein Ausfransen zu vermeiden. Das Abstehen der Mullränder von der Gefäßwand kann durch einen etwa 3,5 cm breiten Streifen einer elastischen Binde, die durch eine Verbandklammer fixiert wird, vermieden werden. Diese Maßnahme ist vor allem dann nötig, wenn man die Gefäße am Kreisschwingschüttler



mittels einer Sperrholzplatte befestigt, die entsprechend runde Öffnungen aufweist, welche über die Hälse der verwendeten ERLÉNMEYER-Kolben gesenkt und gegen den konischen Teil derselben gepreßt wird. Beim Herausheben der Sperrholzplatte über die Wattehauben würden deren abstehende Ränder ein Hindernis bilden, was durch die elastischen Streifen vermieden wird, die ein flaches Anliegen der Ränder an der Gefäßwand bewirken. Mull aus Baumwolle ist solchem aus Zellwolle überlegen; noch günstiger wäre freilich ein lockeres Gewebe aus Leinen- oder Hanffaser.

Was die Dicke der Wattelage anlangt, hat sich eine solche von 2 mm — zwischen zwei Glasplatten ohne besonders ausgeübten Druck gemessen — als genügend erwiesen, um Sterilität zu verbürgen. Andererseits bewirkt eine Verdoppelung der Lage auf 4 mm keine wesentliche Verschlechterung des Luftaustausches. An Stelle der Watte kann auch Zellstoff Verwendung finden.

### *3. Das Arbeiten mit Kulturgefäßen, die Wattehauben-Verschlüsse tragen.*

Zur Keimfreimachung der mit Wattehauben verschlossenen Kulturgefäße werden die mit dem in Betracht kommenden Nährmedium gefüllten und fertig justierten Kolben im Dampftopf oder Autoklav sterilisiert. Man kann aber auch die Entkeimung der leeren mit Wattehaube versehenen Gefäße oder der Wattehauben für sich gesondert im Heißluftsterilisator vornehmen (natürlich ohne Gummiring), jedoch tritt dann eine leichte Gelbfärbung sowie eine Schädigung des Mulls ein, so daß die bei Dampfsterilisierung ohne weiteres mögliche wiederholte Verwendung der Hauben eingeschränkt erscheint.

Die Beimpfung eines mit Wattehaube verschlossenen Kolbens oder die Entnahme von Impfmateriel oder Gärsubstrat aus einem solchen kann mittels Öse bzw. Pipette erfolgen. Auf jeden Fall wird zunächst die Wattehaube mit der Flamme des Bunsenbrenners abgeleckt, wobei anhaftende Staubteilchen verglimmen, dann entfernt man die Klammer samt elastischer Binde und stülpt den Gummiring über die Bördelung des Kolbenhalses, worauf die Kappe nur soweit gehoben wird, als es für das Einführen einer Impföse oder einer Pipette nötig ist. Es muß als ein wesentlicher Vorteil des Wattehauben-Verschlusses betrachtet werden, daß sich alle mikrobiologischen Operationen unter dem Schutze der einseitig gehobenen Haube abspielen, wodurch gegenüber der vollständigen Freilegung der Öffnung des Kulturgefäßes beim Verschluß durch Wattedropfen oder starre Kappen eine erhöhte Infektionssicherheit gewährleistet ist. Schließlich wird der Gummiring wieder um die Bördelung des Kolbens gestülpt und die Binde umgelegt.

Will man mit Nährböden gefüllte Kulturgefäße, die Wattehauben-Verschlüsse tragen, längere Zeit aufbewahren, ohne eine stärkere Verdunstung befürchten zu müssen, so legt man über die äußere Mullschicht eine Metallfolie oder ein Stück Pergaminpapier, Zellophan oder Guttapercha oder zieht eine Gummihäube darüber, worauf der Gummiring aufgesetzt wird.

### *4. Die Stärke der Wasserverdunstung durch die Wattehaube.*

Ähnlich wie dies KNÖLL (1947) bei seinem Wattekappen-Verschluß ausgeführt hat, benutzte auch Verfasser die Stärke der Wasserverdunstung als Maßstab für die Luftversorgung innerhalb der mit Wattehauben

verschlossenen Gefäße. In ERLENMEYER-Kolben zu 200 ml Inhalt aus Jenaer Geräteglas 20 (minimale lichte Halsweite 27 mm) und solche aus Wirag-Geräteglas<sup>1</sup> (mit 37 mm geringstem lichten Halsdurchmesser) wurden je 30 ml dest. Wasser eingebracht und dieselben dann am Kreisschwingschüttler bei  $30 \pm 1^\circ \text{C}$  durch 96 Std geschüttelt. Es ergaben sich die folgenden Durchschnittswerte für je 2 gleichartige Kolben:

Tabelle 1.

Gewichtsabnahme	offen		mit Wattehaube		mit Wattepfropf	
	in g	in %	in g	in %	in g	in %
Wirag-Kolben .	30	100	8,80	29,3	3,18	10,6
Jenaer Kolben .	9,77	32,55 (100)	2,52	8,4 (26,1)	1,70	5,7 (17,5)

Die Klammerwerte geben die Verdunstungsprozente in den Jenaer Kolben an, bezogen auf die Verdunstung im offenen Kolben, die daher mit 100% eingesetzt ist.

Es betrug demnach die Verdunstung in den Wirag-Kolben mit Wattehaube das nahezu 3fache und bei den enghalsigeren Jenaer Kolben das rund  $1\frac{1}{2}$ fache der bei Verschuß mit Wattepfropfen erhaltenen Werte

### 5. Der Materialaufwand.

Da für eine Lage von bloß 2 mm Dicke eine relativ geringe Menge Watte gegenüber einem normalen Pfropf benötigt wird, lassen sich wesentliche Wattemengen einsparen.

Es wurden für die benutzten ERLENMEYER-Kolben an Watte benötigt:

Tabelle 2.

	Wirag-Weithals-Kolben		Jenaer Kolben
a) normaler Pfropfen . . . . .	14 g		9 g
b) Wattelage (2 mm) . . . . .	2,1 g		1,8 g
c) komplette Haube . . . . .	2,1 g Watte + 1,2 g Mull	3,3 g	1,8 g Watte + 0,8 g Mull

Demnach beträgt der Wattaufwand für die Haube beim Wirag-Kolben bloß  $\frac{1}{7}$  und beim Jenaer Kolben rund  $\frac{1}{5}$  der für die Herstellung der gewöhnlichen Pfropfen benötigten Menge; bei Hinzurechnung des Mulls belaufen sich die Werte auf rund  $\frac{1}{4}$  bzw.  $\frac{1}{3,5}$ . Die anderen Bestandteile, wie Gummiring, elastische Binde und Klammer unterliegen nur einer geringfügigen Abnutzung; die Bindestreifen können zeitweilig durch Waschen in Seifenlösung gereinigt werden.

<sup>1</sup> Wiener Radiowerke Akt.-Ges., Glashütte, Wien III, Rennweg 95a.

### Zusammenfassung.

Es wird eine Wattehaube zum Verschluß von Kulturgefäßen beschrieben, die leicht anzufertigen ist, sich durch ökonomischen Materialverbrauch, infektionssicheres Arbeiten sowie günstige Luftdurchgangsverhältnisse auszeichnet und vor allem für die Züchtung streng aerober Mikroorganismen in submerser Schüttelkultur geeignet ist; so hat sich dieselbe zur Kultur von Schimmelpilzen, *Streptomyces*- und *Acetobacter*-Arten am Kreisschwingschüttler bestens bewährt.

### Literatur.

KAPSENBERG, G.: Zbl. Bakter. I. Orig. 146, 80 (1941). — KNÖLL, H.: D.R.P. des Jenaer Glaswerkes Schott u. Gen. Nr. 718. 912 Kl. 30h v. 23. III. 1942. — KNÖLL, H.: Die Pharmazie 2, 264 (1947).



(From the Cytogenetics Laboratory, Indian Institute of Science, Bangalore.)

## Somatic chromosomal reduction in yeast.

By

L. S. PRAHLADA RAO, M. Sc., and M. K. SUBRAMANIAM, M. A., D. Sc.

With 4 figures in the text.

(Eingegangen am 25. Januar 1952.)

In a few previous contributions (SUBRAMANIAM, 1946; 1947; 1948a; 1948b; PRAHLADA RAO and SUBRAMANIAM, 1952), evidences were adduced to show that our control strain of yeast during active aerobic proliferation has only two chromosomes. But the cells of the same strain exhibit endopolyploidy under anaerobic fermentative conditions or when grown on agar slants. Photomicrographs (PRAHLADA RAO and SUBRAMANIAM, 1952) illustrating the ascending grade of complexity of the cytological picture were presented from smears stained by the Feulgen technique. Our description of endopolyploidy in yeasts conforms in procedure to that followed by students of cytology in describing similar phenomena in higher animals.

Endopolyploid cells could be stimulated to divide and when they do so they show irregular segregation of the chromosome complement, micro-nuclei formation, amitosis-like phenomena and often pycnosis (SUBRAMANIAM, 1948b). Because under normal aerobic conditions the cells show only two chromosomes, the higher numbers found in endopolyploid cells should lead one to presume that they are non-viable. In a five-day old fermenting culture, where most of the cells are endopolyploid, tests for viability should indicate only a very small percentage of cells retaining their normal diploid complement of two chromosomes. It is relevant in this connection to remember the remark of EULER et al. (1929): „Auch bei einer so hoch aktiven Trockenhefe, wie die hier verwendete, ist also mehr als 99.98% der gesamten Gärleistung die Wirkung der nicht fortpflanzungsfähigen Zellen“ (p. 243).

### Observations.

#### (1) *Somatic reduction in cells from fermenting liquid cultures.*

In a five-day old fermenting culture stimulated to divide by the addition of fresh wort, SUBRAMANIAM (1948b, p. 329 & figs. 22 and 23) found in addition to the small percentage of diploid cells showing normal mitosis, an abnormal type of segregation by which an endopolyploid cell gave rise to a bud having the normal complement of two chromosomes (fig. 1). The unpredictable nature of the distribution of the chromosome

complement in highly endopolyploid cells renders it impossible to offer critical proof by the selective isolation of such buds. But a description of the phenomenon is possible. In photo. 1b is shown a cell with a bud. The bud has two Feulgen-positive bodies which ought to be identified as the chromosomes. In the mother cell there is a stained nucleus with a pair of chromosomes lying free at one end of the cell (A, in fig. 1a & 1b). If one ignores the reconstituted nucleus in the mother cell, the disposition of the pair of chromosomes is suggestive of late anaphase as illustrated

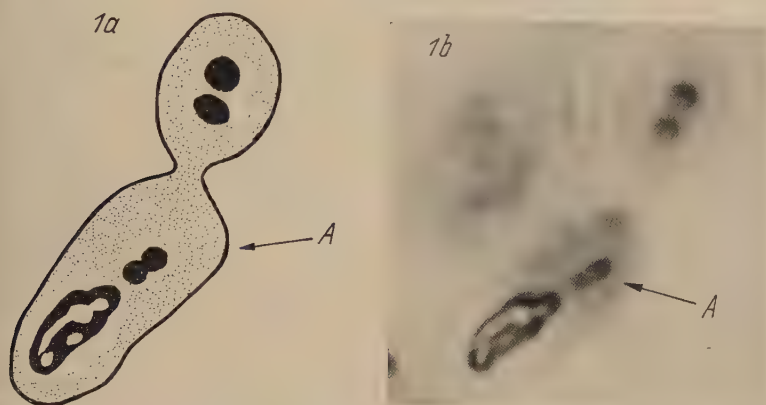


Fig. 1a and 1b. Five-day old fermenting culture stimulated to divide by the addition of fresh wort. The mother cell shows a reconstituted nucleus with a pair of chromosomes lying separated from it (A). The bud has two chromosomes. Osmic-Feulgen.  $\times$  Ca. 4100.

by DURAISWAMI and SUBRAMANIAM (1951). But the reconstituted nucleus together with the fact that the material is from a five-day old fermenting culture stimulated to divide, renders necessary the belief that an endopolyploid cell having given rise to a bud with a diploid complement of two chromosomes, may yet produce another similar cell by the migration of the pair of chromosomes lying separated from the reconstituted nucleus in the mother cell (A, in fig. 1a & 1b). This phenomenon was not elaborately dealt with at that time for the simple reason that the question of the identity of chromosomes in yeasts was itself being debated. There was a much more important reason. When the occurrence of endopolyploidy in yeasts was being reported for the first time, a description and discussion of the phenomena of somatic reduction would have confused a proper appreciation of the problem.

PRAHLADA RAO and SUBRAMANIAM (1952) presented evidence that cells from 24-hour agar slants are endopolyploid. Material streaked on agar slants are apparently growing under aerobic conditions. But their cytological behaviour is indistinguishable from that of actively fermenting cells in liquid media.

*(2) Somatic reduction in cells growing on agar slants.*

The same phenomenon of somatic reduction occurs in the endopolyploid cells from 24-hour agar slant cultures. In fact the pictures are identical. In fig. 2, the bud shows two chromosomes while the complement in the

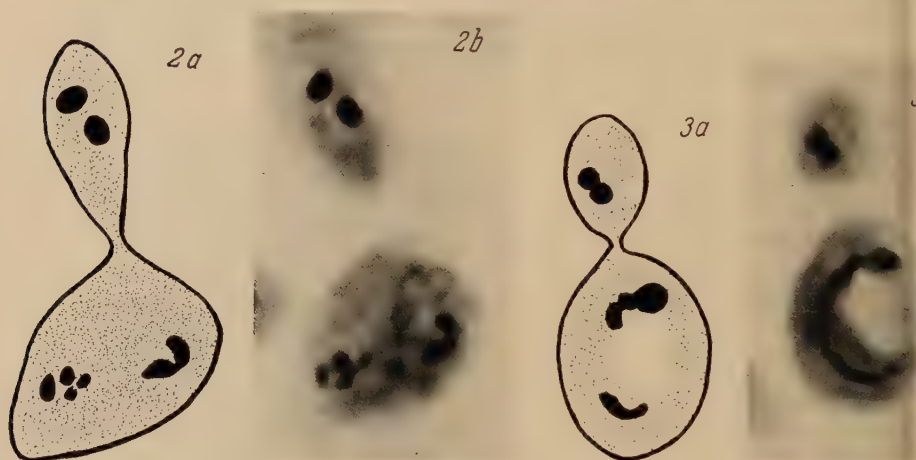


Fig. 2a and 2b. Smear from a 24-hour old agar slant culture. The mother cell shows scattered chromatin masses while the bud has two chromosomes. Osmic-Feulgen.  $\times$  Ca. 6500.

Fig. 3a and 3b. Smear from 24-hour old agar slant culture. The mother cell shows two chromatin masses disposed in a ring while the bud has two chromosomes fusing prior to a return to the resting condition. Osmic-Feulgen.  $\times$  Ca. 6500.

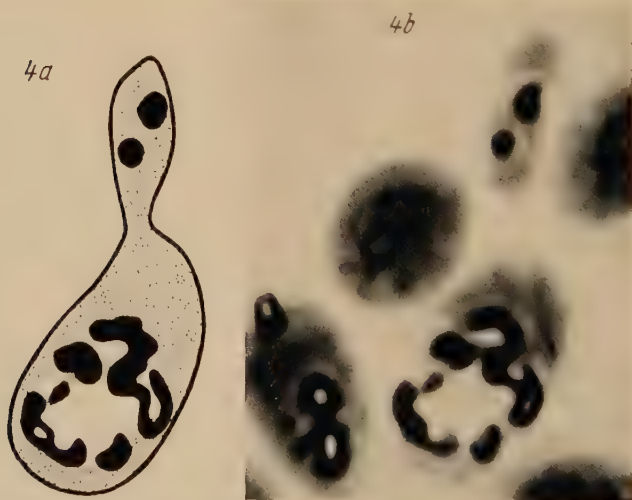


Fig. 4a and 4b. Smear from 24-hour old agar slant culture. The mother cell exhibits a high stage of endopolyploidy with the bodies lying scattered. The bud has two clearly differentiated chromosomes. Osmic-Feulgen.  $\times$  Ca. 7000.



mother cell occurs in two groups. The two chromosomes in the bud in fig. 3, are fusing prior to a reversion to the resting condition, while there are two Feulgen-positive masses in the mother cell. That this phenomenon occurs also at higher stages of endopolyploidy would be evident from fig. 4. The Feulgen-positive masses in the mother cell are complex in their configuration while the bud has only two chromosomes. These four microphotographs offer ample proof for the reality of the phenomenon.

### Discussion.

During particular physiological conditions, the yeast nucleus becomes a complex structure. The assumption of this complexity could be followed up step by step in material smeared directly from an agar slant culture. The earlier demonstration of endopolyploidy in yeasts (SUBRAMANIAM, 1948b) was by an altogether different method of approach. Five-day old fermenting cultures were stimulated to divide by replacement of the spent medium with fresh wort. Investigations on fermenting cultures and samples from agar slants show concordant results. The majority of the cells are endopolyploid. Because of their highly complex nature, endopolyploid nuclei do not show normal segregation of chromosomes into equal complements. The chromosomes in fact lie scattered in the cytoplasm or are segregated into unequal complements. During reconstitution, they may often form one or more nuclei. Just as in highly polyploid cells, mitotic aberrations are the rule rather than the exception. When the chromosome complement has been duplicated several times, stimulation of such resting nuclei results in their appearing scattered in the cytoplasm. WINGE (1951b) objects to the identification of these bodies as chromosomes because they lie scattered in the cytoplasm.

Reasons were adduced by PRAHLADA RAO and SUBRAMANIAM (1952) as to why the phenomena observed in fermenting liquid as well as agar slant cultures have to be evaluated on the basis of observations of normal mitosis in aerobic actively proliferating cultures. If we apply the definition that the "nucleus is a cell body which arises or reproduces by mitosis" (DARLINGTON, 1937, p. 51), then the endopolyploid nuclei in the diverse tissues of the adult *Drosophila*, cannot be identified as nuclei at all. In an adult insect, there is very little cell proliferation. The salivary chromosomes of *Drosophila* are therefore identified as such by deductive reasoning even though the actively secreting cell is incapable of normal mitotic division. But no one has disputed such an identification for the simple reason that the progressive transformation of an indifferent embryonic cell into a differentiated salivary cell has been mapped out. It is this identical method of deductive reasoning that we have employed in our description of endopolyploidy in yeasts. Unlike WINGE (1935) who

identified a Feulgen-positive body as the nucleus without demonstration of a single normal mitosis, we showed normal mitosis during the aerobic phase, offering evidence that the chromosomes are Feulgen-positive, and then traced the ascending grade of endopolyploidy with the help of Feulgen preparations.

It is such endopolyploid cells which give rise to buds having two chromosomes (figs. 1—4). This phenomenon is certainly a case of somatic reduction in chromosome number but it is not comparable to the somatic reduction divisions reported in *Culex* (GRELL, 1946) and some higher plants (HUSKINS, 1947; 1948; WILSON et al, 1951). On the other hand, it cannot be classified as poly-mitosis either, because the bud gets a regular complement of two chromosomes. The rational explanation appears to be that this is a mechanism by which the yeast strain survives in an unfavourable environment even if the small percentage of normal cells die out leaving a population composed purely of endopolyploid cells of varying complexity.

Giving a wrong twist to our published observations, WINGE (1951a) remarks that we have approved of KRUIS and SATAVA's view that "the reduction divisions may occur through a self digestion of a portion of the chromosome complement, assumedly by resorption of all or one of the chromosomes present in a cell" (p. 97). The photographs presented in this paper show an abnormal segregation of the chromosome complement. The mother cells having one or more nuclei show pycnosis and eventual death. A perusal of WHITE's book on Animal Cytology and Evolution (1945) would show that in *Sciara coprophila*, the "limited" chromosomes are selectively eliminated during the early cleavage divisions. In the first meiotic division in the male line, some of the chromosomes are expelled from the cell and they degenerate. Genetical evidence indicated that it is the paternal chromosomes that are got rid of (WHITE, 1945, p. 205). In *Sciara*, the unipolar spindle is responsible for the movement of those chromosomes which are later incorporated in a functional sperm. During the second meiotic division, a bipolar spindle is formed but the segregation is unequal and as in the first division, one of the products of this division also degenerates. Therefore somatic reduction of chromosome number or selective elimination of a single or a group of chromosomes cannot be so "peculiar" as suggested by WINGE (1951a). When nuclear phenomena in yeasts resemble those reported in other organisms, we have to presume that they are as real in yeasts as in higher organisms.

WINGE and ROBERTS (1950) complain that "the hypotheses of the LINDEGREN school have brought a deplorable state of confusion into yeast genetics" (p. 40). The confusion is not so much due to the hypotheses but due to the neglect of cytology by the yeast geneticists

(SUBRAMANIAM, 1950a, b, c; 1951). If they had worked on strains of known chromosomal constitution, the confusion which characterises modern work on yeast genetics could have been avoided. When results capable of being explained on the polyploidy hypothesis are evaluated as occurring in diploids (WINGE and ROBERTS, 1950, p. 78—79), then confusion is unavoidable.

### Summary.

An abnormal type of segregation by which endopolyploid cells give rise to buds having the normal diploid complement of two chromosomes, is described in five-day old fermenting liquid cultures.

Microphotographs are presented to show that the above phenomenon is not confined to liquid cultures alone but occurs also in endopolyploid cells from agar slants.

It is suggested that the mode of segregation described above is a type of somatic reduction in chromosome number by which the yeast strain can survive in an unfavourable environment wherein the population consists predominantly of endopolyploid cells of varying complexity.

### References.

- BARTHEL, CHR., H. V. EULER u. K. MYRBACK: *Z. Physiol. Chemie* **183**, 237 (1929). — DARLINGTON, C. D.: *Recent Advances in Cytology*. London: J. & A. Churchill 1937. — DURAISWAMI, S., and M. K. SUBRAMANIAM: *Cellule* **53**, 215 (1950); *Experientia*, **7**, 422 (1951). — EULER: see BARTHEL. — GRELL, M.: *Genetics* **31**, 60 (1946). — HUSKINS, L.: *Amer. Naturalist* **81**, 401 (1947). — *Nature* **161**, 80 (1948). — PRAHLADA RAO, L. S., and M. K. SUBRAMANIAM: (1952) In Press. — RANGANATHAN, B., and M. K. SUBRAMANIAM: *Proc. Nat. Inst. Sci. India.*, **14**, 389 (1948). — ROMAN, H., D. C. HAWTHORNE and H. C. DOUGLAS: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **37**, 79 (1951). — SUBRAMANIAM, M. K.: *Proc. Nat. Inst. Sci., India.* **12**, 143 (1946); **13**, 129 (1947); **14**, 315 (1948a); **14**, 325 (1948b). — *J. Ind. Inst. Sci.* **32 A**, Part. II **29** (1950a); **32 A**, Part. III, 41 (1950b); **32 A**, Part. V, 73 (1950c). — *Curr. Sci., India* **20**, 257 (1951). — *Cellule*, **54**, 144 (1951b). — WHITE, M. J. D.: *Animal Cytology and Evolution.*: Univ. Press. 1945. — WILSON, G. B., M. E. HAWTHORNE and M. TSOU: *J. Hered.* **42**, 183 (1951). — WINGE, O.: *C. R. Lab. Carlsberg., Ser. Physiol.* **21**, 77 (1935). — WINGE, O., and O. LAUSTSEN: *C. R. Lab. Carlsberg., Ser. Physiol.* **22**, 99 (1937); **23**, 17 (1940). — WINGE, O., and C. ROBERTS: *C. R. Lab. Carlsberg., Ser. Physiol.* **25**, 35 (1950). — WINGE, O.: *C. R. Lab. Carlsberg., Ser. Physiol.* **25**, 85 (1951a). — *Curr. Sci., India* **20**, 236 (1951b).



(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

## Die Energieausnützung durch Mikroorganismen in quantitativer Hinsicht<sup>1, 2</sup>.

Von

A. RIPPEL-BALDES.

(Eingegangen am 29. Januar 1952.)

Es soll hier die Frage nach der Höhe der Energieausnützung bei Heterotrophen (aeroben und anaeroben) sowie bei chemo-autotrophen Mikroorganismen erörtert werden und zwar in bezug auf die gebildete Körpermasse. Gerade den Heterotrophen hat man in neuerer Zeit wenig Beachtung mehr geschenkt. Z. B. werden in dem Buch von STEPHENSON die Autotrophen energetisch sehr ausführlich behandelt, die Heterotrophen in dieser Hinsicht überhaupt nicht berücksichtigt. Der Grund für diese Vernachlässigung ist vielleicht darin zu suchen, daß man die Überzeugung gewann, auf diesem Wege nicht viel weiter zu kommen, eine Meinung, die, wie sich zeigen wird, nicht ganz berechtigt wäre. So treten in neuerer Zeit Untersuchungen über die Energetik der einzelnen Stufenreaktionen und der Energieübertragung in den Vordergrund. Es handelt sich bei der vorliegenden Erörterung jedoch um die spezifisch biologische Fragestellung, in welcher Höhe der Gesamtorganismus die Energie verwertet. Daß energetische Fragen überhaupt auch von vergleichend biologischem Interesse sein können, wurde kürzlich von dem Verf. (RIPPEL-BALDES, 1948) gezeigt. Daneben besitzen die hier behandelten Gebiete selbstverständlich auch Bedeutung in technisch-ökonomischer Hinsicht.

Grundsätzlich wird die Verbrennungswärme, berechnet nach der Bildungswärme (Werte am Schluß der Arbeit), zugrunde gelegt, wie es in der Natur der Fragestellung liegt. Auf die Berücksichtigung der freien Energie wird später gelegentlich hinzuweisen sein.

### *Verbrennungswert und Eignung als Kohlenstoffquelle bei heterotroph aeroben Mikroorganismen.*

Die Entwicklung unserer Kenntnis von der Energieausnützung sei kurz skizziert: PFEFFER hatte den Begriff des ökonomischen Koeffizienten aufgestellt, der in etwas abgeänderter Form bedeutet: g trockene Mikroorganismenmasse auf 100 g

<sup>1</sup> Nach einem Vortrag, gehalten am 13. September 1951 in Münster/Westf. vor der naturwissenschaftlichen Sektion der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie unter dem Titel „Mikrobiologisch-energetische Betrachtungen“. In dem Vortrag waren einige Einzelheiten der vorliegenden Darstellung weggelassen.

<sup>2</sup> HANS FITTING zum 75. Geburtstag gewidmet.

verarbeitete Kohlenstoffquelle. Wegen der verschiedenartigen energetischen Wertigkeit der Kohlenstoffverbindungen führte RUBNER den Koeffizienten Verbrennungswärme der gebildeten Mikroorganismenmasse / Verbrennungswärme der verbrauchten Kohlenstoffquelle ein, wie spätere Autoren formulierten. Diese gewöhnlich anzutreffende Definition ist aber unvollständig bzw. trifft den Kern des RUBNER-Koeffizienten nicht, da der kalorische Restwert der Nährlösung bestimmt wird. Es muß also genauer heißen: Verbrennungswärme der gebildeten Mikroorganismenmasse / Energieabfall der Kohlenstoffquelle. Dieser RUBNER-Koeffizient soll im Folgenden auch als wahrer Nutzwert bezeichnet werden. Hier ist also die Entstehung von unvollkommenen Verbrennungsprodukten belanglos, d. h. entsprechend erfaßt.

Mit Rücksicht auf den zum Aufbau der Mikroorganismenmasse verwendeten Teil der Kohlenstoffquelle (im Gegensatz zu dem zur Erhaltung notwendigen) definierten TERROINE und WURMSER (weiter entwickelt besonders durch TAMURA, 1933): Verbrennungswärme der gebildeten Mikroorganismenmasse / Energieaufwand zum Aufbau. In der historisch wiedergegebenen Reihenfolge der drei Koeffizienten ergeben sich natürlich steigende Werte. Für die vorliegenden Betrachtungen ist es wichtig, daß die Aufbauatmung mit zunehmendem Alter des Organismus immer kleiner wird, bis sie schließlich auf 0 sinkt, während umgekehrt die Erhaltungsatmung schließlich bis zu 100% ansteigt; entsprechend verhält sich dann selbstverständlich der ökonomische Koeffizient.

In Tab. I seien zunächst einige RUBNER-Koeffizienten mitgeteilt, die also durch calorimetrische Bestimmung der Mikroorganismen-trockenmasse, der Ausgangs- und der Restnährlösung gewonnen wurden. Sie bewegen sich demnach bei *Aspergillus niger*, mit welchem Pilz man fast ausschließlich solche Untersuchungen durchführte, zwischen 50 und 60.

Tabelle 1. RUBNER-Koeffizienten bei *Aspergillus niger* und Bakterien.

*Aspergillus niger* nach

MOLLIARD	55,2
TERROINE und WURMSER	59,9
ALGERA	60,4 (ökonomischer Koeffizient 50,2)
RIPPEL und BEHR	51,9 (bei Kaliummangel 37,1)
(Mittel aus 4)	

Verschiedene Bakterien nach

RUBNER	11,6 ( <i>Bact. typhi</i> ) bis 30,8 ( <i>Bact. coli</i> )
--------	--

Wie man sieht, ist der Wert bei Mangelercheinungen (Kaliummangel) wesentlich niedriger. Die Werte sind auch für die angeführten Bakterien niedriger; doch dürften diese Zahlen aus methodischen Gründen zu gering ausgefallen sein<sup>1</sup>. Das Maximum des ökonomischen Koeffizienten, wie es bei Hefe im Lüftungsverfahren gefunden wurde, dürfte bei etwa 52

<sup>1</sup> RUBNER adsorbierte Bakterien an Eisenhydroxyd-Niederschlag; Kontrolle in ungeimpfter Nährlösung. Wenn in dieser, was anzunehmen ist, mehr adsorbierbare Stoffe vorhanden sind als in der von den Bakterien bewachsenen (natürlich abgesehen von den Bakterien selbst), so müssen die Werte der Kontrollen zu hoch ausfallen, zumal bei den äußerst geringen Mengen an Bakterienmasse selbst kleinste Unterschiede einen erheblichen Ausschlag geben müssen.

liegen (FINK). Da hier keine unvollkommenen Oxydationsprodukte gebildet werden, entspricht dieser Wert auch dem durch den Energieabfall festzustellenden. Bei einem Verbrennungswert von 4,8 kcal je 1 g Pilzmasse, von 4,5 kcal bei *Hefe* (s. unten S. 174) würde das einem wahren Nutzwert von 62 entsprechen. Er nähert sich also dem Wert, den TAMIYA mit 85% Energieausnutzung des Aufbaus bei jungem Pilzmycel (*Aspergillus melleus*; Messung nach dem Gasstoffwechsel; bildet nur CO<sub>2</sub> als Oxydationsprodukt) angibt.

Man drückt die Tatsache solch hoher Koeffizienten, wie sie im Lüftungsverfahren erzielt werden, im allgemeinen so aus, daß die gute Sauerstoffversorgung energiesparend wirkt, also mehr organische Substanz zum Aufbau übrig läßt. Vielleicht ist es aber richtiger, folgendermaßen zu sagen: Die Forcierung des Aufbaustoffwechsels (Schnelligkeit) läßt den Erhaltungsstoffwechsel verhältnismäßig stark zurücktreten. Wir werden später den wahrscheinlich umgekehrten Fall bei den chemo-Autotrophen kennenlernen.

Der ökonomische Koeffizient erfuhr eine Ergänzung durch den Fett- und Eiweiß-Koeffizienten (RIPPET, RIPPET und NABEL): g Fett bzw. Eiweiß je 100 g verbrauchte Kohlenstoffquelle, die natürlich ebenfalls auf deren verschiedenen Energiewert bezogen werden können und eine gewisse Analyse der gebildeten Zellbestandteile erlauben. Bei vollkommener Veratmung zu Kohlensäure und Wasser beinhalten sie den RUBNER-Koeffizienten. Die Maximalwerte dieser drei Koeffizienten betragen für den Fall der Glucose und deren vollkommener Veratmung zu Kohlensäure und Wasser in der Reihenfolge ökonom., Fett-, Eiweiß-Koeff. etwa 50, 15 und 25 (wenn man von besonderen Extremwerten absieht); sie können jeweils noch etwas darüber liegen<sup>1</sup>. Es ist ohne weiteres einleuchtend, daß sie in dieser Höhe zusammen nicht verwirklicht sein können, da man dann, einschließlich 20% der C-Quelle für Zellwandbestandteile usw., zu einer kalorischen Ausnutzung von 100 käme, was nicht möglich ist. Tatsächlich ist ja nachgewiesen worden, daß Fett- und Eiweißbildung in vikariierendem Verhältnis zueinander stehen.

Nun ist eine alte Frage die, ob der Verbrennungswert der Kohlenstoffquelle ein Maß für den Nutzwert sein kann, was wohl von den weitaus meisten Autoren bestritten wird und schon von PFEFFER völlig abgelehnt wurde. Es wird sich zeigen, daß diese Frage generell gar nicht zu entscheiden ist und infolge der Dürftigkeit des Versuchsmaterials meist eine unrichtige bzw. unvollkommene Deutung erfahren hat. Tab. 2 gibt ein Beispiel, das für die Stickstoffbindung von *Azotobacter chroococcum* zeigt, daß deren Höhe nicht dem Verbrennungswert der Kohlenstoffquelle entspricht. Denn sie ist zwar bei Mannit höher als bei Glucose, aber in weitaus höherem Maße als dem Verbrennungswert entspricht; und bei Benzoesäure tritt im Vergleich zu Glucose der höhere Verbrennungswert überhaupt nicht hervor. Man muß hier wohl annehmen, daß die Eignung der C-Quelle als Wasserstoffspender für die Stickstoffreduktion entscheidend ist.

<sup>1</sup> Für den Fett-Koeff. vgl. SCHULZE.



Tabelle 2. *N<sub>2</sub>-Bindung und Energiewert der C-Quelle bei Azotobacter chroococcum.*  
(Versuche von W. FISCHER.)

	Kohlenstoffquelle		
	Glucose	Mannit	Benzoessäure
mg N/100 g verbrauchte C-Quelle gebunden	13	18	13
Glucose = 100 . . . . .	100	139	100
Verbrennungswärme, Glucose = 100. . . .	100	107	169

Es trifft jedoch nicht zu, wenn z. B. FOSTER (S. 158) in Übereinstimmung mit zahlreichen früheren Autoren sagt, es sei eine allgemein gültige Erscheinung, daß der Nutzwert um so geringer sei, je geringer die Zahl der C-Atome im Molekül der jeweiligen C-Quelle ist. Diese Meinung kam offenbar daher, daß man im wesentlichen nur Glucose und Äthylalkohol einander gegenüberstellte und weiter auch eine zu enge Auswahl von Mikroorganismen berücksichtigte. Sie kann, um die Sachlage ganz grob auszudrücken, schon deshalb nicht zutreffen, weil es Mikroorganismen gibt, die Glucose überhaupt nicht, Essigsäure aber gut verwerten.

Tab. 3 zeigt ein von ANDERSON (einem der wenigen Autoren, die für die Eignung des Verbrennungswertes eintreten) mitgeteiltes Beispiel, das schlagend beweist, daß in diesem Falle die Mycelbildung dem Verbrennungswert der C-Quelle parallel geht.

Tabelle 3. *Ausnützung einiger C-Quellen durch Aspergillus niger.*

C-Quelle	Verbrennungswert der C-Quelle	Mycelgewicht
Weinsäure . . . . .	46,7	55,8
Citronensäure. . . .	66,1	86,0
Glucose . . . . .	100	100
Glycerin . . . . .	115,2	171,0
Olivenöl . . . . .	249,0	291,5

Organismen, die Essigsäure gut, Glucose jedoch nicht verarbeiten, sind die farblosen Flagellaten, für die Tab. 4 einige Zahlen nach REINHARDT zeigt. In ihr sind die Maximalwerte aufgeführt, die für die angegebenen Stoffe bei Untersuchung zahlreicher Arten ermittelt wurden. Die erste Zahlenspalte zeigt den normalen ökonom. Koeff., die zweite den Wert, der sich ergibt, wenn man diese Zahl in % des Energiewertes der betreffenden Verbindung, bezogen auf Glucose, ausdrückt. Der in eckige Klammern gesetzte Wert für Glucose ist aus dem Maximalwert für Essigsäure berechnet, da ja diese Organismen Glucose nicht verarbeiten. Bei Essigsäure (*Polytoma ocellatum*) wird augenscheinlich fast der volle „Zuckerwert“ erreicht; denn unter Berücksichtigung des Verbrennungswertes der Mikroorganismenmasse würde die Zahl 48,0 um etwa 20%

höher liegen, also ein wahrer Nutzwert von fast 60 erreicht sein. Für Äthylalkohol (*Polytomella caeca*) liegt der Maximalwert des ökonom. Koeff. ebenso hoch wie für Zucker (bei diesem angenommene Zahl!); gemessen am Verbrennungswert ist er aber zweifellos unterlegen, da im Vergleich zur Glucose nur 53,7% im Baustoffwechsel ausgenutzt wurden.

Tabelle 4. Ökonom. Koeff. bei farblosen Flagellaten für einige Kohlenstoffquellen.

	Ökonom. Koeff.	Ausnützung nach dem Energiewert (auf Glucose bezogen) in %
Glucosewert, calorisch nach Essigsäurewert 48,0	[51,8]**	100
Maximalwert für Essigsäure ( <i>Polytoma ocellatum</i> )	48,0**	100
Maximalwert für Äthylalkohol ( <i>Polytomella caeca</i> )	52,8**	53,7
Maximalwert für Dioxyaceton* ( <i>Polytomella agilis</i> )	32,2	62,3
Essigsäure bei <i>Polytomella caeca</i>	19,2	40,0
Essigsäure bei <i>Polytomella agilis</i>	19,2	40,0
Äthylalkohol bei <i>Polytoma ocellatum</i>	41,6	42,4

\* Weniger Arten geprüft als bei den übrigen C-Quellen.

\*\* Der Glucosewert ist aus der Essigsäurezahl 48,0 in calorischem Verhältnis berechnet; daher muß die Ausnützung beider = 100 gesetzt sein. Für Äthylalkohol gestaltet sich die Berechnung folgendermaßen:  $51,8 \times 1,9$  (calorisches Verhältnis Äthylalkohol zu Zucker je Gewichtseinheit) = 98,4. Davon ist der gefundene Wert 52,8 = den in der rechten Spalte angegebenen 53,7%.

Allerdings müßte diese Zahl sich noch um etwa 25% erhöhen, da in den Versuchen von REINHARDT je Einheit der Nährlösung gleiche Mengen C gegeben wurden<sup>1</sup>. Wenn also auch der Äthylalkohol der Glucose gegenüber unterlegen ist, so ist er immerhin noch sehr hochwertig, wenn man mit den Ergebnissen anderer Autoren vergleicht, in denen schon der ökonom. Koeff. weit unter dem des Zuckers liegt.

Nicht alle farblosen Flagellaten verhalten sich in der geschilderten Weise. Wie die weiteren Zahlen der Tab. 4 zeigen, liegt für *Polytomella caeca*, mit dem hohen Alkoholwert, der Essigsäurewert sehr tief. Dioxyaceton (*Polytomella agilis*) und noch mehr (der in der Tabelle nicht aufgenommene) Glycerinaldehyd sind im maximalen Nutzwert der Essigsäure merklich unterlegen, und Glucose wird, wie schon erwähnt, überhaupt nicht verarbeitet. Dioxyaceton ist aber für *Polytomella agilis* besser geeignet als Essigsäure. Man kann offenbar aus solchen Zahlen zunächst alles herauslesen, je nachdem, wie man gerade an einen entsprechenden Ausschnitt gerät.

<sup>1</sup> Für Essigsäure mit gleichem relativen C-Gehalt wie die Glucose käme diese Korrektur nicht in Frage.

Tab. 5 gibt weiterhin einige Zahlen von Bakterien (nach RIPPEL u. Mitarb.) und *Proactinomycceten* (nach MÜLLER), die zeigen, daß auch bei diesen der ökonom. Koeff. so hoch sein kann wie bei Pilzen, damit auch der wahre Nutzwert. Denn der hier erreichte Eiweiß-Koeffizient von 32,8 für Glucose + Ammonphosphat und *Bacillus glycinophilus* würde bei einem Eiweißgehalt von  $\frac{2}{3}$  der Trockenmasse<sup>1</sup> einem ökonom. Koeff.

Tabelle 5. Eiweiß-Koeffizient für einige C-Quellen bei *Bacillus glycinophilus*.

C-Quelle	Eiweiß-Koeffizient	Kalorischer Wert der C-Quelle, auf Glucose bezogen
Glucose . . . . .	22,8	
Essigsäure . . . . .	21,0	21,2
Oxalsäure . . . . .	10,0	4,1
Ameisensäure . . . . .	10,0	8,3
Buttersäure . . . . .	22,3	35,5
Weinsäure . . . . .	7,2	11,2
Citronensäure . . . . .	5,0	15,0
Glucose . . . . .	32,8	

Versuche von RIPPEL und Mitarbeitern.  
Desgleichen für eine *Proactinomyces*-Art

Glucose . . . . .	20,0	
Oxalsäure . . . . .	5,3	3,7

Versuche von H. MÜLLER

von 49 entsprechen und, unter Berücksichtigung des Verbrennungswertes der Mikroorganismenmasse, einem wahren Nutzwert von fast 60, wie bei den Pilzen. Die Zahlen zeigen weiter, daß tatsächlich auch hier die Kohlenstoffquellen teilweise nach Maßgabe des Verbrennungswertes ausgenützt werden. Am schlagendsten dürften das die Zahlen für Oxalsäure bei *Proactinomyces*<sup>2</sup> und Ameisensäure (bei *Bacillus glycinophilus*) zeigen, die, unter Berücksichtigung des Verbrennungswertes, denen der Glucose entsprechen. Weiterhin aber sieht man, daß in Tab. 5 für *Bac. glycinophilus* Buttersäure der Essigsäure unbedingt unterlegen ist, zwar nicht in der Gewichtsbilanz, aber in der energetischen Bilanz, während Wein- und Citronensäure in beiden Hinsichten stark unterlegen sind; für *Aspergillus niger* hingegen entsprechen nach Aussage der Tab. 3 diese beiden Säuren energetisch der Glucose.

<sup>1</sup> Der Eiweißgehalt betrug bei diesen Versuchen rund 50%, jedoch nach 14tägiger Kulturdauer. Obige Zahlen stammen von 4 Tage alten Kulturen, bei denen der Eiweißgehalt wohl etwas höher war. Im übrigen würde bei geringerem Eiweißgehalt der ökonomische Koeffizient noch höher ausfallen. Der Ammonphosphatwert ist das Mittel aus 8 Einzelwerten.

<sup>2</sup> Der Wert für Oxalsäure bei *Bacillus glycinophilus* ist, offenbar infolge methodischer Unzulänglichkeit, viel zu hoch, jedenfalls aber nicht zu niedrig.



Aus solchen Beobachtungen, wie sie vorstehend geschildert werden, läßt sich nur der eine Schluß ziehen, daß die C-Quellen dann für einen Organismus nach Maßgabe des Verbrennungswertes nutzbar sind, wenn sie in seinen Stoffwechsel hineinpassen, wenn sie stoffwechselgemäß sind. Denn *Bac. glycinophilus* und farblose *Flagellaten* (diese von PRINGSHEIM als Acetat-Organismen bezeichnet) sind ausgesprochene Essigsäure-Organismen, *Aspergillus niger* aber bildet Citronensäure und, wenn auch in sehr geringem Maße, Weinsäure als Zwischenprodukte (in physiologischem Sinne!) und verarbeitet sie später. Die *Proactinomyces*-Art aber ist spezifisch auf Oxalsäure eingestellt, wie H. MÜLLER zeigte. Es erscheint durchaus möglich, daß entsprechende quantitative Untersuchungen über den wahren Nutzwert der C-Quellen Anhaltspunkte für den Gang der Verarbeitung geben könnten, wie man sie mit Hilfe anderer Methoden gewinnen kann.

In neuester Zeit haben SIEGEL und CLIFTON zu zeigen versucht, daß bei der oxydativen Assimilation von *Bacterium coli* kein Zusammenhang mit dem Energiegehalt der gebotenen Kohlenstoffquelle bestehe. Das wird daraus geschlossen, daß 1 mol Arabinose eine größere Ernte ergab als 1 mol Lactose. Aber die Energiefrage bedeutet ja nicht, wieviel von der C-Quelle absolut umgesetzt wird; denn es könnte ja die Lactose deshalb schlechter verwertet werden, weil nicht genügend

Tabelle 6. Kohlenstoffökonomie bei *Bacterium coli*.

C-Quelle	Verbrennungswärme je 1 g		C-Ernte / C verbraucht × 100 (Zahlen von CLIFTON u. SIEGEL)	
		in %		in %
Glycerin . . . . .	4,32	100	70	100
Glucose . . . . .	3,74	86,2	56—60	82,9
Milchsäure . . . . .	3,57	69,0 (außer Milchsäure)	40—44	60,0
Brenztraubensäure . . . . .	3,17			
Bernsteinsäure . . . . .	3,02			
Fumarsäure . . . . .	2,76			

Lactase geliefert würde, weil eine stärkere Säuerung hemmend eingreifen könnte oder aus irgendwelchen anderen Gründen. Entscheidend für die Energiefrage ist allein die relative Verwendung der umgesetzten Menge der Kohlenstoffverbindung. So erhalten die genannten Autoren für Lactose, Glucose und Arabinose fast die gleichen Werte (55 bzw. 59 bzw. 64: Ernte an Kohlenstoff / verbrauchtem Kohlenstoff mal 100). Tab. 6 zeigt weiter einige Zahlen dieser Autoren, die schlagend beweisen, daß sich die Eignung der Kohlenstoffquelle völlig nach dem Verbrennungswert richtet (nur die Milchsäure fällt ein wenig heraus); diese Tatsache dürfte kaum zu übersehen sein.

Noch auf einen Punkt ist hier kurz einzugehen: Nach einer verbreiteten neueren Anschauung (Literatur bei SIEGEL und CLIFTON) ist die Eignung einer C-Quelle weniger vom calorischen Wert abhängig als

davon, wie weit sie geeignet ist, Stoffwechselmaterial bereitzustellen. Hinsichtlich der Bereitstellung von Aufbaumaterial deckt sich diese Anschauung mit den hier angestellten Überlegungen. Aber das schließt natürlich nicht aus, daß diese Bereitstellung nur im Rahmen des energetisch Möglichen erfolgte; das Gegenteil wäre sogar undenkbar. Bereitstellung von Material und Energieumsatz werden vermutlich stofflich gar nicht zu trennen sein. Denn auch der Energieumsatz wird sich an den am leichtesten erreichbaren Stoffen vollziehen, also an den gleichen, die zu anderer Verwendung bereitgestellt werden.

*Die Energieverhältnisse  
bei den heterotroph anaeroben Mikroorganismen.*

Bei den bisher besprochenen Fällen handelt es sich um aerobe Mikroorganismen. Es ist nun eine bekannte Tatsache, daß bei anaeroben Mikroorganismen wesentlich niedrigere Koeffizienten erhalten werden. Ich führe hierzu, in Übersetzung, WAKSMAN (S. 420) an: „Hinsichtlich der Energieausnützung durch verschiedene Gruppen von Mikroorganismen kann gesagt werden, daß Pilze 30—60% des Substrates in Mycel überführen, aerobe Bakterien 10—20%, anaerobe Bakterien dagegen nur 1% oder weniger der Nährstoffe zu Zellsubstanz synthetisieren können.“ Eine solche Formulierung ist nur bedingt richtig. Denn in ihr stecken 2 Begriffe: Einmal die stoffliche Umwandlung, sodann die energetische Umwandlung. Sie beantwortet aber nicht die Frage nach der Höhe der Energieausnützung, bezogen auf die wirklich umgesetzte Energie. Mit anderen Worten: sie spricht nur von dem ökonom. Koeff., bezieht aber den Begriff Energie ein, ohne ihn jedoch zu berücksichtigen, also den RUBNER-Koeffizienten = wahren Nutzwert. Wir haben aber schon gesehen, daß dieser für aerobe Bakterien recht hoch sein kann, wobei zunächst noch die Frage offen bleibt (auf die noch einmal zurückzukommen sein wird), ob im allgemeinen der Wert bei Bakterien niedriger liegt als bei Pilzen.

Leider sind mir für *anaerobe Bakterien* (und *Hefen*) keine brauchbaren Zahlen bekannt. Aber die Werte lassen sich leicht errechnen und mit den bekannten ökonom. Koeff. vergleichen, wie es in Tab. 7 geschehen ist. Es sind also, gemäß den Zahlen in der letzten Spalte, sehr hohe Nutzwerte möglich, im niedrigsten Falle bei der Alkoholgärung 25,1% für den ökonom. Koeff. 1. In Tab. 7 sind einige durch KAUFMANN gewonnene ökonom. Koeff. eingetragen, die nach dieser Tabelle den wahren Nutzwerten zugeordnet werden können: Für die Alkoholgärung der *Hefe*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Die gefundenen Werte bewegten sich zwischen ökonomischen Koeffizienten 1 und 11, je nach dem Verlauf der alkoholischen Gärung, worauf hier nicht eingegangen werden kann. Die obigen Zahlen sind in vergleichbaren Nährlösungen gewonnen.





Die unter der Tab. 7 angegebenen energetischen Werte<sup>1</sup> der jeweiligen Reaktion zeigen, daß die gefundenen ökonom. Koeff. offenbar nach Maßgabe des Verbrennungswertes (gemäß  $\Delta H$ ) abgestuft sind, für Bakterien von der Buttersäure- über Milchsäure- zur Essigsäuregärung (anaerob). Die Änderung der freien Energie ( $\Delta F$ ) scheint hingegen den Verhältnissen weniger gut zu entsprechen<sup>2</sup>. Mit Ausnahme der Milchsäuregärung (ohne Neutralisationsenergie!) sind die  $\Delta H$ - und  $\Delta F$ -Werte nicht sehr verschieden. Daß der niedrigere ökonom. Koeff. bei der Milchsäuregärung durch die geringere freie Energie bedingt sei, ist unwahrscheinlich, wie ein Versuch von KAUFMANN mit *Pseudomonas Lindneri* (führt als einziges Bakterium eine fast reine Alkoholgärung wie die *Hefe* durch) zeigte: Der ökonom. Koeff. betrug 3,4, bei der *Hefe* unter gleichen Bedingungen 7,1. Man sieht, daß der ökonom. Koeff. entsprechend dem gleichen energetischen Erfolg (nach  $\Delta H$ ) wie bei der Milchsäuregärung auch gerade so hoch ist wie bei dieser (*Bact. Delbrückii*), aber geringer als bei der *Hefe*.

Das führt uns wieder auf einen schon kurz angedeuteten Gesichtspunkt, ob nämlich die energetische Ausnützung bei Bakterien im allgemeinen niedriger ist als bei Pilzen. Leider liegt kaum weiteres Beobachtungsmaterial vor, nach dem die Frage entschieden werden könnte, zumal die in Tab. 1 angegebenen RUBNERSchen Zahlen methodisch wohl fraglich sind. So kann nur gesagt werden, daß eine geringere energetische Ausnützung durch Bakterien verständlich wäre. Denn in der kleinen Bakterienzelle wird die innere Bewegung in der Zelle einen viel größeren Energieaufwand erfordern (Reibungswiderstand) als in der größeren Pilzzelle. Hinzu kommt u. U. die aktive Beweglichkeit der Bakterienzelle. Ferner werden bei kleineren Zellen höhere Energieaufwendungen zur Überwindung von Oberflächenkräften notwendig sein usw.

Noch ein anderer Gesichtspunkt ergibt sich aus der Tab. 7: Es wurde gesagt, daß *Ps. Lindneri* als einziges Bakterium eine fast reine Alkoholgärung, *Bact. Delbrückii* als einziges eine reine Milchsäuregärung durchführt. Für die Buttersäuregärung scheint der Fall einer reinen Gärung überhaupt nicht bekannt zu sein. Die Zahlen der Tab. 7 zeigen, daß hier auch sehr ungünstige energetische Verhältnisse vorliegen ( $-\Delta H = 17,0$ ). Ganz anders bei der anaeroben Essigsäuregärung, die weitaus günstiger

<sup>1</sup> Die Werte sind als  $-\Delta H$  bzw.  $-\Delta F$  angegeben, damit ein positives Vorzeichen (das  $+$  Zeichen ist weggelassen) anzeigt, daß Energie für den Organismus verfügbar ist.

<sup>2</sup> Die außerordentliche Wichtigkeit der Berücksichtigung der freien Energie bei der Betrachtung der einzelnen Stufenreaktionen wird hiervon natürlich nicht berührt. Ob in der Gesamtheit des Stoffwechsels besser die freie Energie einzusetzen wäre, ist eine ganz andere und durchaus zweifelhafte Frage. Auf jeden Fall handelt es sich dann nur um ein „kann“, nicht um ein „muß“, und die freie Energie muß aus dem Reservoir der Reaktionswärme gespeist werden (vgl. die Elementarzyklen von SCHULZ).

ist ( $-\Delta H = 51,5$ ). Nun führen die gärenden Bakterien im allgemeinen gemischte Gärungen durch, und hiermit ist offenbar ein Weg gefunden, den Stoffwechsel energetisch günstiger zu gestalten. Denn es ist klar, daß die gleichzeitige Bildung von Essigsäure neben den anderen Produkten diesen Erfolg haben muß. Tab. 8 zeigt ein solches Beispiel von

Tabelle 8. *Energieverhältnisse von Gemischtgärungen.*

	$-\Delta H$	$-\Delta F$
$C_6H_{12}O_6 + H_2O = CH_3 \cdot CH_2OH + CH_3 \cdot COOH + 2 CO_2 + 2 H_2$	4,6	52,5
Äthylalk. Essigsäure Wasserstoff		
$C_6H_{12}O_6 = 2 CH_3 \cdot CHOH \cdot COOH$ Milchsäure . . . . .	23,0	31,8
$2 C_6H_{12}O_6 + H_2O = 2 CH_3 \cdot CHOH \cdot COOH + CH_3 \cdot CH_2OH$		
+ $CH_3 \cdot COOH + 2 CO_2 + 2 H_2$ . . . . .	13,8	42,2
Milchs. Äthylalk. Essigs. Wasserstoff		
$2 C_6H_{12}O_6 = CH_3 \cdot CHOH \cdot COOH + CH_3 \cdot CH_2 \cdot COOH$		
+ $CH_3 \cdot CH_2OH + CH_3 \cdot COOH + 2 CO_2 + H_2$ . . . . .	27,9	54,2
Milchs. Propions. Äthylalk. Essigs. Wasserstoff		
$2 C_6H_{12}O_6 = CH_3 \cdot CHOH \cdot COOH + HOOC \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$		
+ $CH_3 \cdot CH_2OH + CH_3 \cdot COOH + CO_2 + H_2$	32,0	52,3
Milchs. Bernsteins. Äthylalk. Essigs. Wasserstoff	je 1 mol Glucose	

*Milchsäurebakterien*<sup>1</sup>. Zum Vergleich ist die Alkoholgärung bei Dismutation des Acetaldehyds zu Äthylalkohol und Essigsäure, jedoch angenommener Entstehung von freiem Wasserstoff (anstatt der Bildung von Glycerin), die bekanntlich nicht vorkommt und auch energetisch offenbar nicht möglich erscheint trotz der hohen freien Energie. Denn es müßte nicht nur das, wenn auch geringe, Defizit von  $-4,6$  kcal gedeckt werden, sondern auch darüber hinaus natürlich noch der weitere „normale“ Energiebetrag aufgebracht werden. Man sieht nun weiter, wie bei der Milchsäuregärung die energetischen Verhältnisse bei Bildung verschiedener Nebenprodukte günstiger werden und sogar die Bildung von freiem Wasserstoff ermöglicht wird, die auch tatsächlich vorhanden ist. Entsprechend könnte natürlich auch die Buttersäuregärung mit ihren Nebengärungen betrachtet werden. Auffallend mag erscheinen, daß die energetisch so günstige anaerobe Essigsäuregärung nicht häufiger in reiner Form verwirklicht ist, was aber vielleicht nur an unseren geringen Kenntnissen liegt. Denn immerhin sind *anaerobe Cellulosezerersetzer* und *Clostridium*-Formen (*Bacillus thermoaceticus*, *Bac. welchii*) als so arbeitende

<sup>1</sup> Vgl. auch A. RIPPEL-BALDES, Grundriß, S. 280. Durch Verwendung anderer Werte weichen die Zahlen ein wenig voneinander ab. — Im übrigen sind eine Reihe der in dieser Arbeit vorgetragenen Gesichtspunkte in diesem Buch noch nicht berücksichtigt.

Formen bekannt geworden; die reine Form der anaeroben Essigsäuregärung scheint also doch verbreiteter unter den Bakterien zu sein als die der anderen Typen.

*Die Energieverhältnisse bei den chemo-autotrophen Bakterien.*

Nun zu den chemosynthetischen Vorgängen, die deshalb in diesem Zusammenhange besonders merkwürdig sind, weil bei ihnen, im Gegensatz zu den bisher besprochenen Typen, der Nutzwert nach den vorliegenden Angaben ungewöhnlich tief liegt. Eine höhere Ausnützung des eigentlichen, energieliefernden Vorganges würde aber, wie zu zeigen sein wird, bedingen, daß organische Substanz gebildet und veratmet wird. Dieser Gesichtspunkt soll hier erörtert und in seiner Konsequenz verfolgt werden, ohne daß dabei entschieden werden kann, ob er tatsächlich richtig ist. Im Gegensatz dazu ist es die herrschende Auffassung, daß der den chemosynthetischen Aufbau ermöglichende Oxydationsvorgang zugleich auch der Atmungsvorgang sei. Das ist vielleicht erstaunlich insofern, als man bei den grünen Pflanzen ja auch nicht mit einer anderen Übertragung der Sonnenenergie rechnet als vermittels der in der Veratmung der in der Photosynthese erzeugten Assimilate gewonnenen, wozu hier ja schon die heterotrophe Lebensweise während der Dunkelheit sowie die der unterirdischen Organe zwingt. Es liegt nun eigentlich kein Grund vor, für die chemosynthetisch arbeitenden Mikroorganismen etwas anderes anzunehmen. Einerseits vermögen sie ja auch heterotroph zu leben, andererseits ist für sie eine echte Atmung (auf organischer Grundlage) festgestellt, etwa wenn der zu oxydierende Stoff im Substrat erschöpft ist. Selbst bei den *Nitrifikanten*, bei denen der Nachweis nicht-chemosynthetischer Oxydationsvorgänge am hartnäckigsten trotzte, ist Sauerstoffverbrauch nach Erschöpfung des anorganischen Oxydationssubstrates nachgewiesen (BÖMEKE, 1939), wenn auch kein Wachstum auf organischen Stoffen (BÖMEKE, 1950), ebenso eine echte Atmung bei *Thiobacillus thioxydans* (VOGLER, S. 112), bei dem im Gegensatz zu anderen *Schwefelbakterien* noch keine Kultur auf organischem Substrat gelang. Tatsächlich müssen auch die Autoren, z. B. bei der Wasserstoffoxydation, mit einer normalen Atmung rechnen. Man vergleiche im übrigen die Diskussion bei VAN NIEL sowie die Ausführungen von KLUYVER u. MANTEN.

Es ist vielleicht angebracht, in diesem Zusammenhang darauf hinzuweisen, daß man vielfach die chemosynthetisch arbeitenden Mikroorganismen für ursprüngliche Typen hält, die ihre Tätigkeit aus Zeiten herleiten sollen, in denen noch kein Chlorophyll „entdeckt“ war. Nichts spricht indessen für diese Auffassung, weder der komplizierte Aufbau der physiologischen Apparatur dieser „Primitiven“ noch z. B. die Tatsache, daß die in Frage kommenden Mikroorganismen sich auf alle Gruppen verteilen, was nur für einen sekundären Erwerb sprechen kann. VAN NIEL hat dies im Zusammenhang mit der hier erörterten Frage scharf betont. Um so

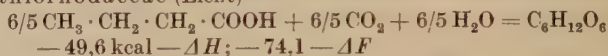


mehr ergibt sich, daß es zum mindesten wünschenswert ist, bei den Chemoautotrophen von der Annahme einer normalen Atmung auszugehen.

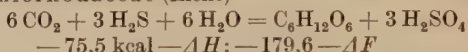
Die folgende Tab. 9 gibt nun zunächst die energetischen Verhältnisse der wichtigsten chemotroph verlaufenden mikrobiologischen Vorgänge wieder unter der Voraussetzung einer direkten Reaktion des betreffenden Stoffes mit der Kohlensäure bei Bildung organischer Substanz, die als Glucose angenommen ist. Die Energiezahlen zeigen, daß zur Bildung von je 1 Mol Glucose ein nach den einzelnen Reaktionen verschiedener Energiebetrag aufzuwenden ist, der (in vorläufiger Annahme!) durch zusätzliche Licht-<sup>1</sup> bzw. Oxydationsenergie beschafft werden muß.

Tabelle 9. *Energieverhältnisse der autotrophen Bakterien.*

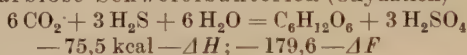
Athiorhodaceae (Licht)



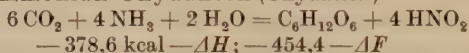
Thiorhodaceae (Licht)



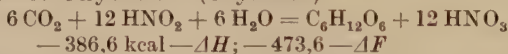
Farblose Schwefelbakterien (Oxydation)



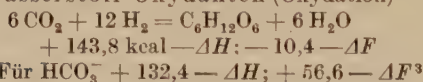
Ammoniak-Oxydanten (Oxydation)



Nitrit-Oxydanten (Oxydation)<sup>2</sup>



Wasserstoff-Oxydanten (Oxydation)



Zunächst geht also daraus hervor, daß die Wasserstoff-Oxydation stark abseits steht. Ihr  $-\Delta H$  ist mit 143,4 kcal je Mol Glucose stark positiv, während die freie Energie  $-\Delta F$  mit  $-10,4$  schwach negativ ist (hinsichtlich der Vorzeichen vgl. oben S. 175, Anm. 1). Die weitere Besprechung soll vorerst bei diesem Beispiel bleiben.

Es sei jedoch noch auf eine ganz andere Erscheinung aufmerksam gemacht: Wie man sieht, würde die Bildung von 1 Mol Glucose bei der Nitrit-Oxydation einen 3 mal so großen Stickstoffumsatz erfordern als bei der Ammoniak-Oxydation.

<sup>1</sup> Die bakterielle Photosynthese ist hier vergleichsweise hinzugenommen.

<sup>2</sup> Die zum Teil starke Abweichung von den bei RIPPEN-BALDES (1948) gegebenen Zahlen erklärt sich daraus, daß dort mit den undissoziierten Säuremolekülen gerechnet wurde; hinsichtlich der hier verwendeten Zahlen siehe Anhang.

<sup>3</sup> Für ionisierte Kohlensäure  $\text{HCO}_3^-$  (RUHLAND arbeitete mit Bicarbonat) ergibt sich also  $-\Delta H$  zu  $+132,4$  und  $-\Delta F$  zu  $+56,6$  kcal. Bei der Photosynthese (vgl. RABINOWITSCH) rechnet man allerdings mit der Verarbeitung von molekularem  $\text{CO}_2$ .

Wenn nun im Boden annähernd gleiche Massen von *Nitrosomonas* und *Nitrobacter* zusammenliegen, wird Nitrit, weil es in größerer Menge gebraucht wird, ein Mangelstoff sein. So erklärt sich also die schnelle Verarbeitung von Nitrit, in deren Folge es bekanntlich im Boden niemals als Zwischenprodukt der Salpeterbildung nachzuweisen ist, von rein energetischen Gesichtspunkten aus.

Für die *wasserstoffoxydierenden Bakterien* zeigt nun Tab. 10 die Verhältnisse, wenn entweder organische Substanz in einer Primärreaktion aus  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2$  gebildet (Gruppe A) oder  $\text{H}_2$  in der Knallgasreaktion

Tabelle 10. Wasserstoff-Autotrophie.

## Gruppe A.

Chemosynthese	I	$3,5 [12 \text{ H}_2 + 6 \text{ CO}_2 = \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{ H}_2\text{O}]$ $3,5 [+ 143,8 \text{ kcal} - \Delta H; - 10,4 - \Delta F]$
Atmung	II	$2,5 [\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{ O}_2 = 6 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O}]$ $2,5 [+ 677 \text{ kcal} - \Delta H; + 689,6 - \Delta F]$
Bilanz	III	$42 \text{ H}_2 + 15 \text{ O}_2 + 6 \text{ CO}_2 = \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 36 \text{ H}_2\text{O}$ $+ 2190,7 \text{ kcal} - \Delta H; + 1687,6 - \Delta F$

## Gruppe B.

Knallgasreaktion	Ia	$3,5 [12 \text{ H}_2 + 6 \text{ O}_2 = 12 \text{ H}_2\text{O}]$ $3,5 [+ 820,8 \text{ kcal} - \Delta H; 679,2 - \Delta F]$
$\text{CO}_2$ -Reduktion	Ib	$3,5 [6 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O} = \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{ O}_2]$ $3,5 [+ 677,0 \text{ kcal} - \Delta H; + 689,6 - \Delta F]$
Atmung	II	$2,5 [\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{ O}_2 = 6 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O}]$
Bilanz	III	$42 \text{ H}_2 + 15 \text{ O}_2 + 6 \text{ CO}_2 = \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 36 \text{ H}_2\text{O}$

Energieumsatz bei II und III wie bei Gruppe A.

verbrannt und die Oxydationsenergie zur sekundären Bildung organischer Substanz durch  $\text{CO}_2$ -Reduktion (mit Wasser) benutzt wird (Gruppe B). Man ersieht daraus, daß sich aus der Bilanz kein Schluß auf den Weg ziehen läßt<sup>1</sup>, wie das ja auch von RUHLAND und von VAN NIEL (der ein allgemeines Formelschema ohne Einzelberechnungen angibt) schon betont wurde. Rein bilanzmäßig ergibt sich eine Energieausnützung von 30,8% für  $-\Delta H$  und von 40,8% für  $-\Delta F$ , bei einem Verhältnis von  $\text{H}_2/\text{CO}_2 = 7$ , von 26,0 bzw. 34,6% für ein Verhältnis von  $\text{H}_2/\text{CO}_2 = 8$  (vgl. Tab. 12)<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Nach dem 1. thermodynamischen Hauptsatz ist die Energiebilanz unabhängig von den Energieänderungen der Teilvorgänge. Daraus folgt, daß auch keine Aussagen über den Verlauf der chemischen Umsetzungen gemacht werden können.

<sup>2</sup> Die von anderen Autoren berechneten Werte sind auf das Verhältnis  $\text{H}_2/\text{CO}_2 = 8$  bezogen. Die RUHLANDSchen Zahlen stimmen zu beiden, da sie naturgemäß etwas schwanken. Durch etwas abweichende energetische Berechnungen erhielten andere Autoren etwas andere Werte, nämlich 20,5 für  $-\Delta H$  und 26,4 für  $-\Delta F$ . Grundsätzlich ändert sich dadurch nichts. — Auch die für die übrigen chemosynthetischen Vorgänge hier berechneten Zahlen weichen von denen anderer Autoren (BAAS-BECKING und PARKS, RABINOWITSCH, STEPHENSON) etwas, wenn auch nur ganz geringfügig, ab, infolge Verwendung ein wenig abweichender calorischer Werte. Die hier verwendeten sind am Schluß angegeben.

Ganz anders wird das Bild, wenn man nach der Energieausnützung in der Primärreaktion (Tab. 10, Gruppe A, I) fragt. Man kommt dann für  $-\Delta H$  auf 82,9, für  $-\Delta F$  auf fast 100%<sup>1</sup>. Denn laut Gleichung I in Tab. 10 würde für je 1 Mol Glucose ein Überschuß von 143,5 kcal ( $-\Delta H$ ) vorhanden sein;  $677,0 + 143,5 = 820,5$ ;  $677,0/820,5$  mal 100 = 82,9. Für die freie Energie käme eine annähernd 100% ige Ausnützung heraus. Bei Annahme von  $\text{HCO}_3^-$  würden die Werte lauten für  $-\Delta H$  83,7% und für  $-\Delta F$  92,4%. Darauf wird noch zurückzukommen sein.

Tabelle 11. Nitrit-Autotrophie.

Gruppe A.		
Chemosynthese	I	43,5 [ $6 \text{ CO}_2 + 12 \text{ HNO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O} = \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 12 \text{ HNO}_3$ ] 43,5 [ $-386,6 \text{ kcal} - \Delta H$ ; $-473,6 - \Delta F$ ]
Atmung	II	42,5 [ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{ O}_2 = 6 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O}$ ] 42,5 [ $677,0 \text{ kcal} - \Delta H$ ; $689,6 - \Delta F$ ]
Bilanz	III	522 $\text{HNO}_2 + 6 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O} + 255 \text{ O}_2 = \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 522 \text{ HNO}_3$ + 11945,4 kcal $-\Delta H$ ; + 8707 $-\Delta F$
Gruppe B.		
$\text{HNO}_2$ -Oxydation	Ia	43,5 [ $12 \text{ HNO}_2 + 3 \text{ O}_2 = 12 \text{ HNO}_3$ ] 43,5 [ $290,4 \text{ kcal} - \Delta H$ ; $216 - \Delta F$ ]
$\text{CO}_2$ -Reduktion	Ib	43,5 [ $6 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O} = \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{ O}_2$ ] 43,5 [ $-677,0 \text{ kcal} - \Delta H$ ; $-689,6 - \Delta F$ ]
II und III wie oben.		

Vor der weiteren Besprechung seien noch in Tab. 11 die entsprechenden Zahlen für die Nitrit-Oxydation gegeben, die natürlich grundsätzlich das gleiche zeigen, nur mit dem Unterschied, daß in der Primärreaktion (Gleichung I) das  $-\Delta H$  stark negativ ist und  $-\Delta F$  noch viel stärker negativ als in Tab. 10. Hier müßte natürlich die Ausnützung in der Primärreaktion in beiden Fällen 100% betragen; darüber wird unten noch zu sprechen sein.

Schließlich sei in Tab. 12 noch die Energiebilanz der wichtigsten chemo-autotrophen Mikroorganismen gegeben, zusammen mit den zugrunde liegenden Versuchszahlen. Sie zeigt die geringe Ausnützung von 5—7% für  $\Delta H$ , von 8—9% für  $\Delta F$ , mit Ausnahme der Wasserstoff-Oxydation, wie oben schon festgestellt wurde.

Daß die Werte für die  $\text{H}_2$ -Bakterien höher liegen als für die anderen, ist aus den energetischen Zahlen der Tab. 9 ohne weiteres verständlich. Es ist aber auffallend, wie sehr sie (natürlich unter entsprechender Berücksichtigung der energetischen Verhältnisse) von dem für Heterotrophe ermittelten wahren Nutzwert 60 abweichen. Für die Wasserstoffbakterien ergibt sich laut Tab. 9 bei der Bildung von 1 Mol Glucose

<sup>1</sup> Man vergleiche die Stellungnahme von VAN NIEL und RABINOWITCH in den Ausführungen von BURK.



$677 + 143,8 = 820,8$  kcal, welcher Wert somit 21% höher liegt als die 677 kcal für 1 Mol Glucose bei Heterotrophen. Die tatsächlich gefundene Energieausnützung beträgt aber laut Tab. 12 nur etwa  $1/2,5$  des wahren Nutzwertes 60. Für die Nitrifikanten ergibt sich entsprechend  $677-380$  (abgerundet für  $\text{NH}_3$ - und  $\text{NO}_3$ -Oxydanten) = 297 kcal je Mol Glucose; das sind nur 44% davon. Danach müßte der wahre Nutzwert um 25 liegen, liegt aber laut Tab. 12 nur etwa bei 5—6. In beiden Fällen liegt also die Energieausnützung erheblich tiefer als sie erwartet werden könnte.

Tabelle 12. Energiebilanz der chemo-autotrophen Mikroorganismen.

$\text{H}_2$ -Oxydation: $3,5/2,5$ ; $\text{H}_2/\text{CO}_2 = 7-8/1$	
$42 \text{ H}_2 + 15 \text{ O}_2 + 6 \text{ CO}_2 = \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 36 \text{ H}_2\text{O}$	
Energieausnützung für 7/1 bei $\Delta H$ 30,8%, bei $\Delta F$ 40,8%	
,, „ 8/1 bei $\Delta H$ 26,0%, bei $\Delta F$ 34,0%	
$\text{NH}_3$ -Oxydation: $45/44$ ; g N/g C = 35	
$180 \text{ NH}_3 + 6 \text{ CO}_2 + 264 \text{ O}_2 = \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 180 \text{ HNO}_3 + 174 \text{ H}_2\text{O}$	
Energieausnützung bei $\Delta H$ 5,3%, bei $\Delta F$ 7,7%	
$\text{NO}_2$ -Oxydation: $43,5/42,5$ ; g N/g C = 101	
$522 \text{ HNO}_2 + 6 \text{ CO}_2 + 255 \text{ O}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O} = \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 522 \text{ HNO}_3$	
Energieausnützung bei $\Delta H$ 5,7%, bei $\Delta F$ 7,9%	
S-Oxydation: $18/17$ ; g S/g C = 32	
$72 \text{ S} + 6 \text{ CO}_2 + 102 \text{ O}_2 + 78 \text{ H}_2\text{O} = \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 72 \text{ H}_2\text{SO}_4$	
Energieausnützung bei $\Delta H$ 7,1, bei $\Delta F$ 8,7%	
$4 \text{ S} + 6 \text{ CO}_2 + 10 \text{ H}_2\text{O} = \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 4 \text{ H}_2\text{SO}_4$	
— 110,4 kcal $\Delta-H$ ; — 150,0 $-\Delta F$	

In der obersten Zeile geben die Zahlen  $3,5/2,5$  bzw.  $45/44$  usw. an, wie die Gleichungen gemäß I und II der Tab. 10 und 11 lauten. In der gleichen Zeile folgen die Angaben über die Stoffverhältnisse, die im Versuch gefunden wurden (in obiger Reihenfolge: RUHLAND, MEYERHOF, MEYERHOF, WAKSMAN und STARKEY). Die zweite Zeile zeigt die Bilanzgleichung, die dritte die Höhe der Energieausnützung für  $\text{CO}_2$ -Gas. Für  $\text{HCO}_3^-$ , dessen Einsetzung richtiger wäre (vgl. oben S. 178), würden sich die Verhältnisse etwas günstiger gestalten, sich aber nicht grundsätzlich ändern. Daher seien die bisher von den Autoren benutzten Werte angeführt.

Bei der S-Oxydation ist auch die Formel entsprechend Tab. 9 angegeben, da dort nur die  $\text{SH}_2$ -Oxydation berücksichtigt wurde.

Diese Verhältnisse werden noch ungünstiger, wenn der neue, von BÖMEKE (1951) beschriebene Nitritbildner *Nitrosomonas oligocarophilus* zur Berechnung herangezogen würde, der im Vergleich zur *Nitrosomonas europaea* (mit einem C/N-Verhältnis 35) ein solches von 70 hat, also doppelt so ungünstig arbeitet. Ferner ist offensichtlich, daß bei der Schwefeloxydation durch *Bacillus thiooxydans* ebenfalls sehr ungünstige Verhältnisse vorliegen. Nach den Angaben in Tab. 9 und 12 müßte dieses Bakterium viel günstiger arbeiten als die Nitrifikanten (— 110,4 gegen — 378,6 kcal). Ein Grund hierfür kann nicht angegeben werden. Jedenfalls wäre es sehr wünschenswert, diese Verhältnisse aufzuklären.

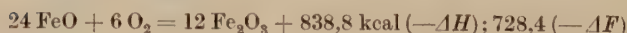
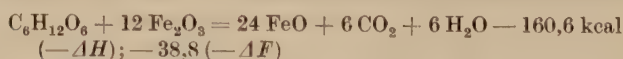
Da derartige Versuche vielfach kurzfristig nach der WARBURG-Technik vorgenommen werden, so sei noch darauf hingewiesen, daß damit unter Umständen Ergebnisse erzielt werden können, die den Verhältnissen nicht entsprechen, unter denen der Organismus natürlich heranwächst, wie S. 183 Anm. 1 von einer Feststellung VAN NIELS erwähnt ist. Auch auf die ungeheuren Unterschiede, die sich infolge der verschiedenartigen Behandlung der Zellen ergeben können, sei noch besonders hingewiesen; man vgl. z. B. die Zahlen in Tab. 3, S. 587 bei SIEGEL und CLIFTON für gewaschene Zellen und normale Kulturen.

Gegen die hier gemachte Annahme können verschiedene Punkte angeführt werden, die zum mindesten eine Erschwerung für die Richtigkeit bedeuten würden.

Zunächst ist darauf hinzuweisen, daß die Reaktionen der Chemoautotrophen (von der Wasserstoff-Oxydation abgesehen) gemäß Tab. 9 unter erheblichem Energieaufwand in der Primärreaktion verlaufen. Aber da diese Reaktionen normalerweise mit der Atmung gekoppelt wäre (vgl. Tab. 10 und 11), so wäre von dieser aus die Lieferung der notwendigen Energie ohne weiteres möglich. In Tab. 11 würden bei der Nitrit-Oxydation für die Bildung von 1 Mol Glucose 386,8 kcal ( $\Delta H$ ) aufzuwenden sein, wonach durch die Veratmung der Glucose immer noch ein Überschuß von  $(677,0 - 386,8) = 290,2$  kcal übrig bliebe. Grundsätzlich, wenn auch in anderer Größenordnung, gilt für die freie Energie ( $\Delta F$ ) das gleiche.

Diese Betrachtung gibt nun auch die Erklärung, warum bei der bakteriellen Photosynthese die Energiezufuhr durch das Licht notwendig ist: Unter den anaeroben Verhältnissen kann natürlich die Rückgewinnung der aufgewendeten Energie (dazu noch die normalerweise notwendige Energie) nicht auf dem Wege der anaeroben Veratmung (Vergärung) von organischer Substanz gewonnen werden. Nur bei der Wasserstoff-Autotrophie, die sich auch bei nicht photosynthetisch arbeitenden Formen anaerob vollzieht (vgl. S. 186), scheint dies möglich zu sein, wofür ebenfalls die oben in Tab. 9 aufgeführten Werte der Energieverhältnisse die Erklärung geben.

Tabelle 13. *Energieverhältnisse der Ferri<sup>+++</sup>-Oxydation von Glucose.*



Man könnte nun einwenden, die Annahme eines dem Energiegewinn vorgeschalteten Energieaufwandes sei gezwungen und unwahrscheinlich. Das ist aber nicht der Fall; vielmehr ist auch bei anderen zentralen Vorgängen in der Zelle ein Gleiches festzustellen. In Tab. 13 sind die Werte für die Ferri<sup>+++</sup>-Oxydation von Glucose zu CO<sub>2</sub> und Wasser

angegeben, unter Reduktion zu  $\text{Fe}^{++}$ . Man sieht hier ebenfalls eine bedeutende Energieschwelle vor dem Energiegewinn: Die Oxydation durch  $\text{Ferri}^{+++}$  kann nur durch Reoxydation des  $\text{Fe}^{++}$  und Verwendung der dabei gewonnenen Energie erfolgen.

Weiterhin scheint aus der gemachten Annahme der Primärreaktion zu folgen, daß die Energie dieser Primärreaktion, d. h. der gegenüber der Veratmung von 1 Mol Glucose erzielte Überschuß von 290,2 kcal ( $-\Delta H$ ) zu 100% in den gesamten Energieumsatz hineingesteckt würde. Abgesehen aber davon, daß dies schon aus theoretischen Gründen (Entropie!) nicht möglich sein könnte, läßt sich auch aus den obigen Formeln darüber gar nichts aussagen. Diese bedeuten hier lediglich Symbole, Abstraktionen, für noch völlig unbekannte Vorgänge, die derart miteinander verkoppelt sind, daß sie praktisch in realer Form gar nicht zu erfassen sind. Das würde wohl erst möglich sein, wenn alle Stufen dieser gekoppelten Reaktion bekannt wären und man aus den Entropiedaten der einzelnen Vorgänge die mögliche Nutzarbeit ableiten könnte. Vielleicht kann man sagen, daß die Energieausnützung in der Primärreaktion sehr hoch sein dürfte, jedenfalls viel höher als die in Tab. 12 wiedergegebenen Werte, und man kann wohl auch sagen, daß sie sich dem hohen Energieausnutzungswert nähern müßten, wie er zur Zeit für die Photosynthese angenommen wird<sup>1</sup>.

Darüber hinaus bleibt aber die Tatsache bestehen, daß die Energieausnützung in der Gesamtheit, wie oben erwähnt wurde (abgesehen von den Wasserstoffbakterien), abnorm niedrig liegt, wenn man mit den oben für die Heterotrophen gegebenen Werten vergleicht. Wie ist das nun zu erklären? Wenn wirklich, nach der hier auseinandergesetzten Möglichkeit, der Primärreaktion eine Veratmung darin gebildeter organischer Substanz folgt, so kann es sich nur um die Frage des Verhältnisses von Aufbau- zu Erhaltungsstoffwechsel handeln. Möglicherweise liegt eine gewisse Erklärung für das Überwiegen des Erhaltungsstoffwechsels in dem äußerst langsamen Stoffwechsel, wie er uns z. B. in ausgesprochenem Maße bei den *Nitrifikanten*, die ja in dieser Hinsicht am extremsten stehen, entgegentritt. Umgekehrt wie bei der oben (S. 168) erwähnten Forcierung des Aufbaustoffwechsels im Lüftungsverfahren wird hier die Langsamkeit des Aufbaustoffwechsels den Erhaltungsstoffwechsel

<sup>1</sup> Auf die Photosynthese der höheren grünen Pflanzen soll natürlich nicht eingegangen werden. Es sei nur darauf hingewiesen, daß bei dieser die Frage der Energieausnützung nur von der Primärreaktion aus gestellt wird, somit mit dem Gesamtenergieumsatz der Chemoautotrophen oder auch der Heterotrophen nicht vergleichbar ist. Man müßte sonst bei der Photosynthese ebenfalls den gesamten sekundären Verlust durch Atmung mit berücksichtigen. Eine ähnliche Wirkung hat, worauf VAN NIEL hingewiesen hat, die kurzfristige Kultur photosynthetisch arbeitender Einzeller.



verhältnismäßig stark hervortreten lassen. Damit ist natürlich noch nichts über die Ursache dieser Langsamkeit des Stoffwechsels ausgesagt. Es liegt jedoch nahe, anzunehmen, daß der ungewöhnlich starke Energiezuschuß, der zunächst zur Synthese nötig sein würde, einen starken Bremsklotz darstellt, dessen Überwindung den Stoffwechsel so verlangsamt.

Ein sehr gewichtiger Einwand gegen die hier erörterte Vorstellung einer Primärreaktion im Sinne der Formeln der Tab. 9 könnte gemacht werden, wenn es gelänge, bei den Chemoautotrophen eine oxydierende Phase völlig von der  $\text{CO}_2$ -Reduktion zu trennen. RUHLAND hat diesen Versuch bei dem wasserstoffautotrophen *Bacillus pycnoticus* gemacht (ebenso später KLUYVER u. MANTEN) VOGLER bei dem Schwefel-autotrophen *Thiobacillus thiooxydans*.

RUHLAND erkennt allerdings, wenn er auch zur Bejahung des Leerlaufes der Wasserstoff-Oxydation (also bei Fehlen von  $\text{CO}_2$ ) neigt, nicht die Schwierigkeiten, die in der Möglichkeit des Nachweises liegen. Tatsächlich können Gründe gegen den Leerlauf angeführt werden: Die von RUHLAND selbst hervorgehobene Unmöglichkeit des Ausschaltens der Atmung, die natürlich das Gasverhältnis (das gemessen wurde) beeinflussen muß. Bei den RUHLANDSchen Versuchen sank tatsächlich das Verhältnis  $\text{H}_2/\text{O}_2$  beträchtlich unter 2 (um 1,8; genau zu dem gleichen Wert kamen später KLUYVER u. MANTEN), was, wie er selbst betont, die Folge einer weitergehenden Veratmung von organischer Substanz ist. Daraus geht also hervor, daß eine genaue Erfassung infolge des Zurückflutens von  $\text{CO}_2$  nicht möglich war. Hierbei ist sehr wesentlich, daß zu den Versuchen von RUHLAND eine „größere Zahl<sup>1</sup> üppig gewachsener Kahlhäute“ verwendet wurde, die sicherlich viel Reservematerial führten, wodurch eine weitere Verminderung der Möglichkeit des Nachweises eines Leerlaufes der  $\text{H}_2$ -Oxydation eintreten mußte. Auch die von KLUYVER u. MANTEN gemachte Beobachtung, daß in Gegenwart von Lactat noch  $\text{H}_2$ -Oxydation stattfindet, braucht nicht zum Schluß einer Unabhängigkeit von dieser und der Oxydation organischer Substanz zu führen. Denn es kann sehr wohl sein, daß Milchsäure dem „Primärprodukt“ fernersteht und daher die Primärreaktion nicht hemmt.

VOGLER glaubt den einwandfreien Beweis eines Leerlaufes der S-Oxydation bei *Thiobacillus thiooxydans* erbracht zu haben. Eine nähere Betrachtung der von ihm mitgeteilten Zahlen zeigt indessen, daß auch hier dieser Beweis nicht geglückt ist, wie im Folgenden gezeigt werden soll. Bei der Wichtigkeit dieser Frage sei die von VOGLER gebrachte Table III (S. 111) nachstehend wiedergegeben (Tab. 14).

<sup>1</sup> Von RUHLAND gesperrt.

Daraus ergibt sich, daß die CO<sub>2</sub>-Aufnahme durch die Bakterien-Suspension in den Flaschen 1 und 2 (ohne Schwefel) in CO<sub>2</sub>-haltigem Medium unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre im Mittel 72,5 µl betrug, bei 3 und 4 (mit Schwefel) 72 µl (drittletzte Spalte). Bei der anschließenden Sauerstoffzufuhr in CO<sub>2</sub>-freier Luft (vorletzte Spalte) nahmen die Flaschen 1 und 2 praktisch keinen, die Flaschen 3 und 4 viel Sauerstoff auf, was eben als reine S-Oxydation gedeutet wird. Wieder in H<sub>2</sub>-Atmosphäre + CO<sub>2</sub> gesetzt (letzte Spalte), nahmen die Flaschen 1 und 2 keine CO<sub>2</sub> mehr auf, die Flaschen 3 und 4 aber im Mittel 58,5 l, also fast die schon vorher festgestellte Menge.

Tabelle 14. [Table III nach VÖGLER (S. 111)]. CO<sub>2</sub> Uptake in Absence of Oxygen. 200 microgram bacterial N per flask.

Flasks 5 ml. suspension	CO <sub>2</sub> uptaken		
	Under H <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> uptake over 2 Hrs.	Under H <sub>2</sub>
1 Endogenous. . . . .	75	4	0
2 Endogenous. . . . .	71	4	1
3 + sulfur . . . . .	70	600	61
4 + sulfur . . . . .	74	600	56

The oxygen uptakes recorded are estimates based on values for endogenous respiration and S oxidation observed with the same suspension.

Aber diese Zahlen können doch nur folgendes zeigen: Bei Flaschen 1 und 2 war die CO<sub>2</sub>-Aufnahme gesättigt; bei fehlendem Schwefel konnte auch keine Verarbeitung stattfinden, daher auch keine CO<sub>2</sub>-Aufnahme in der letzten Spalte. In Gegenwart von Schwefel dagegen erfolgt eine nochmalige CO<sub>2</sub>-Aufnahme von fast, wenn auch nicht ganz, der Größenordnung wie vorher. Das besagt zunächst nichts anderes, als daß im Laufe der O<sub>2</sub>-Versorgung mit S-Verarbeitung (die ja, wie oben ausgeführt, nur gekoppelt mit der Atmung vor sich gehen könnte) durch das Verschwinden der Kohlensäure Platz für eine Neuaufnahme geschaffen wurde, wie sie auch die letzte Spalte zeigt.

Endlich aber: Es entfielen auf 72 CO<sub>2</sub> 600 O<sub>2</sub>, also 12 : 100, während laut Tab. 12 das Verhältnis 6 : 100 (rund) lauten würde. Nun ist aber zu berücksichtigen, daß in dem CO<sub>2</sub>-freien Aufenthalt auch durch Veratmung von organischem Material der Zelle (eine von VÖGLER S. 112 ausdrücklich hervorgehobene Tatsache) CO<sub>2</sub> gebildet werden mußte, wodurch wiederum (bei Gegenwart von Schwefel) die CO<sub>2</sub>-Verarbeitung in Gang kommen konnte. Da aber diese endogen entstandene CO<sub>2</sub> in der Bilanz ausfällt, jedoch nicht der laut der Formel in Tab. 12 notwendige Sauerstoff, so muß sich der Anteil O<sub>2</sub> zum aufgenommenen CO<sub>2</sub> erhöhen und sich dem Verhältnis 6 : 100 nähern.

Mithin lassen sich die von VÖGLER veröffentlichten Zahlen vollkommen nach den hier gegebenen Vorstellungen erklären.

Einige weitere Beobachtungen könnten für die direkte Reaktion der Kohlensäure mit H<sub>2</sub> usw. sprechen: Für *Nitrifikanten* wurde Hemmung der NH<sub>3</sub>- bzw. NO<sub>3</sub>-Oxydation durch organische Stoffe festgestellt (BOLTJES, BÖMEKE, 1939), ferner Hemmung der Schwefel-Oxydation bei *Thiobacillus thiooxydans*, wenn auch in diesem Falle nur durch gewisse organische Säuren (VÖGLER, LE PAGE und

UMBREIT). Zurückdrängung der Wasserstoff-Oxydation durch organische Stoffe gibt RUHLAND für *Bacillus pycnoticus* an, die er jedoch mit der Änderung des  $pH$ -Wertes nach der sauren Seite erklärt, während nach VAN NIEL möglicherweise Adaptation, Selektion oder beides als Erklärung heranzuziehen wären. Weiterhin hat man für die  $H_2$ -Verarbeitung die unbedingte Notwendigkeit der Gegenwart von  $CO_2$  festgestellt (z. B. LEE und UMBREIT), was an sich schon gegen das Vorhandensein des oben erörterten Leerlaufes sprechen würde. Indessen glaubt VAN NIEL, daß diese Tatsache einstweilen nicht in der hier zur Diskussion stehenden Frage beweisend sein könne, wegen der allgemeinen Bedeutung der  $CO_2$  auch für die Heterotrophen.

Mag man nun auch in den angeführten Beobachtungen im Zusammenhang mit den oben gemachten Ausführungen über den „Leerlauf“ keinen Beweis für die direkte Reaktion der Kohlensäure sehen, so muß doch andererseits zugegeben werden, daß sie auch nicht dagegen sprechen. Einige neuere Beobachtungen scheinen mir aber doch stärker für die direkte  $CO_2$ -Reaktion zu sprechen: Bei *Vibrio desulfuricans* (BUTLIN und ADAMS, SISLER und ZOBELL) und bei *Purpurbakterien* (ROELEFSON) ist die autotrophe anaerobe Verarbeitung von Wasserstoff nachgewiesen, bei *Bacillus acidi urici* (WIERINGA, BARKER u. Mitarb.) die Bildung von Essigsäure und Glycocoll aus Kohlensäure und Wasserstoff.

Die Tatsache jedenfalls, daß sich aus den obigen Ausführungen für alle mikrobiologischen Stoffwechselvorgänge eine gleichartige physiologische Basis ergibt, scheint mir Grund genug, die sich ergebenden Ausblicke weiterer, insbesondere experimenteller Prüfung zu unterziehen.

### Zusammenfassung.

Eine Prüfung von Literaturangaben und theoretischen Überlegungen ergab folgende Gesichtspunkte:

Die Höhe der Bildung von Mikroorganismenmasse richtet sich nach dem Verbrennungswert der Kohlenstoffquelle, vorausgesetzt, daß diese in den Stoffwechsel des jeweiligen Organismus paßt. Die quantitative Feststellung des wahren Nutzwertes von C-Quellen könnte sich als ein Mittel erweisen, den Gang der Verarbeitung festzustellen.

Zwischen aerober und anaerober Atmung (Gärung) ist in Hinsicht auf die Beziehung der Bildung von Körpermasse zu der tatsächlich umgesetzten Energie kein Unterschied. Der wahre Nutzwert (RUBNER-Koeffizient) ist in beiden Fällen hoch (normales Maximum etwa 60).

Absolut genommen ist natürlich die Bildung von Körpermasse bei der anaeroben Atmung geringer. Am günstigsten liegt die anaerobe Essigsäuregärung, am ungünstigsten die Buttersäuregärung. Das Überwiegen von „gemischten“ Gärungen bei Bakterien, namentlich solchen mit Bildung von Essigsäure, stellt offenbar ein Mittel dar, die Bildung von Körpermasse zu erhöhen bzw. den absoluten Energiegewinn zu steigern.



Für die chemoautotrophen Bakterien wird die Vorstellung geprüft, daß der „Oxydationsvorgang“ nicht den Atmungsvorgang darstellt, sondern daß die  $\text{CO}_2$  direkt mit dem betreffenden Stoff ( $\text{H}_2$ ,  $\text{SH}_2$ ,  $\text{NH}_3$  usw.) reagiert und dann der Luftsauerstoff gebildete organische Substanz veratmet. Die in der Primärreaktion wahrscheinlich hohe, in der Gesamtbilanz sehr niedrige Energieausnützung kann durch das Überwiegen des Erhaltungs- über den Baustoffwechsel gedeutet werden.

Damit dürfte eine einheitliche Basis für den Aufbaustoffwechsel der verschiedenen Typen gegeben sein.

#### Die benutzten calorischen Daten.

Da diese Daten häufig etwas voneinander abweichen, seien hier die Daten für die Stoffe gegeben, die für die vorliegenden Berechnungen benutzt wurden.

	$-\Delta H$	$-\Delta F$		$-\Delta H$	$-\Delta F$
Glucose aeq . . . . .	300,4	217,0	$\text{HCO}_3^-$ aq . . . . .	164,6	140,0
Essigsäure 1 . . . . .	117,2	94,5	$\text{SH}_2$ aq undiss. . . . .	9,4	6,5
Äthylalkohol 1 . . . . .	67,1	42,6	$\text{NH}_3$ aq undiss. . . . .	19,4	6,3
Milchsäure 1 . . . . .	161,7	124,4	$\text{FeO}$ s . . . . .	64,3	58,9
Propionsäure . . . . .	121,5	91,6	$\text{Fe}_2\text{O}_3$ s . . . . .	197,6	178,5
Bernsteinsäure . . . . .	224,2	182,7	$\text{H}_2\text{SO}_4$ gel. = $\text{SO}_4^{4-}$ . . . .	209,8	176,5
Buttersäure 1 . . . . .	128,8	91,5	$\text{HNO}_2$ gel. = $\text{NO}_2^-$ . . . .	25,6	8,5
Wasser . . . . .	68,3	56,6	$\text{HNO}_3$ gel. = $\text{NO}_3^-$ . . . .	49,8	26,5
$\text{CO}_2$ -Gas . . . . .	94,5	94,5			

#### Literatur.

- ALGERA, L.: Rec. trav. bot. néerland. **29**, 47 (1932). — ANDERSON, C. G.: Bacteriological Chemistry. Edinburgh. 2. Auf. 1948. — BAAS-BECKING, M., and G. S. PARKS: Physiologic. Rev. **7**, 85 (1927). — BARKER, H. A., u. Mitarb.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA **26**, 426 (1940); J. of Biol. Chem. **167**, 619 (1947). — BOLTJES, K.: Arch. f. Mikrobiol. **6**, 79 (1935); **7**, 188 (1936). — BÖMEKE, H.: Arch. f. Mikrobiol. **10**, 385 (1939); **14**, 271 (1950); **15**, 414 (1951). — BURK, D.: J. Physic. Chem. **35**, 432 (1931). — BUTLIN, K. R., and M. E. ADAMS: Nature (Lond.) **160**, 154 (1947); J. gen. Microbiology **3**, 46 (1949). — FINK, H., u. J. KREBS: Biochem. Z. **299**, 1 (1938). — FISCHER, W.: Arch. f. Mikrobiol. **14**, 353 (1950). — FOSTER, J. W.: Chemical Activities of Fungi. New York: Academ. Press. Inc. Publ. 1949. — KAUFMANN, W.: Untersuchungen über den Energiehaushalt der Hefezelle und die Ökonomie einiger Energiestoffwechseltypen anderer Mikroorganismen. Diss. Göttingen 1951. Auszug erscheint im Arch. f. Mikrobiol. — KLUYVER, A. J., u. A. MANTEN: Antonie van Leeuwenhoek **8**, 71 (1922). — MEYER, R.: Arch. f. Mikrobiol. **13**, 250 (1943). — MEYERHOF, O.: Pflügers Arch. **166**, 240 (1917). — MOLLIARD, M.: C. R. soc. biol. **87**, 219 (1922). — MÜLLER, H.: Arch. f. Mikrobiol. **15**, 137 (1950). — VAN NIEL, C. B.: Physiologie. Rev. **23**, 338 (1943). — PFEFFER, W.: Pflanzenphysiologie. I. Bd. Stoffwechsel. Leipzig: W. Engelmann 1897. — PRINGSHEIM, E. G.: Ber. dtsch. bot. Ges. **38** (8) (1920); Beitr. allg. Bot. **2**, 88 (1921). — RABINOWITCH, E. I.: Photosynthesis and related Processes. New York: Interscience Publishers Inc. 1945. — REINHARDT, K.: Arch. f. Mikrobiol. **15**, 270 (1950). — RIPPEL, A.: Arch. f. Mikrobiol. **11**, 271 (1940). — RIPPEL, A., u. K. NABEL: Arch. f. Mikrobiol. **10**, 359 (1939); **12**, 285 (1942). — RIPPEL-BALDES,

A.: *Biolog. Cbl.* **67**, 60 (1948); *Grundriß der Mikrobiologie*. Berlin-Göttingen-Heidelberg: J. Springer, Verlag 1952. 2. Aufl. — ROELEFSON, P. A.: *Proc. Acad. Soc. Amsterdam* **37**, 660 (1934). — RUBNER, M.: *Arch. f. Hyg.* **57**, 193 (1906). — RUHLAND, W.: *Jb. wiss. Botanik* **63**, 321 (1924). — SCHULZ, G. V.: *Naturwiss.* **37**, 196, 223 (1950). — SCHULZE, K. L.: *Arch. f. Mikrobiol.* **15**, 315 (1951). — SIEGEL, B. V., and C. E. CLIFTON: *J. Bacter.* **60**, 113, 573, 585 (1950). — SISLER, F. D., and CL. E. ZOBELL: *J. Bacter.* **60**, 747 (1950). — STEPHENSON, M.: *Bacterial metabolism*. London-New York-Toronto: Longman, Green & Co. 1949. 3. Aufl. — TAMIYA, H.: *Acta phytochim.* (Tokyo) **6**, 265 (1932). — TAMIYA, H., and S. YAMAGUTCHI: *Acta phytochim.* (Tokyo) **7**, 43 (1933). — TERROINE, E. F., et R. WURMSER: *Bull. Soc. Chim. biol. Paris* **4**, 519 (1922). — VOGLER, K. G.: *J. gen. Physiol.* **26**, 103 (1943). — VOGLER, K. G., and W. W. UMBREIT: *J. gen. Physiol.* **26**, 157 (1943). — VOGLER, K. G., G. A. LE PAGE and W. W. UMBREIT: *J. gen. Physiol.* **26**, 89 (1943). — WAKSMAN, S. A.: *Principles of Soil Microbiology*. London: Baillière, Tindall & Cox. 1932. 2. Aufl. — WAKSMAN, S. A., and R. L. STARKEY: *J. gen. Physiol.* **5**, 285 (1922). — WARBURG, O., and D. BURK: *Arch. Biochemistry* **25**, 410 (1949). — WIERINGA, K. T.: *Antonie van Leeuwenhoek* **3**, 1 (1936).

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Rostock.)

## Zur Keimungsphysiologie von *Ustilago zeae*.

Von

HERMANN VON GUTTENBERG und INGRID STRUTZ.

(Eingegangen am 18. Februar 1952.)

### 1. Die Keimung der Brandsporen.

#### a) Literaturübersicht.

Die Bedingungen, die eine Keimung der Brandsporen, darunter auch die von *Ustilago zeae*, ermöglichen, wurden schon von verschiedener Seite geprüft. BREFELD (1912) stellte für diesen Pilz fest, daß u. a. 5%ige Bierwürze, nicht zu saure Fruchtsäfte und Pferdemist gute Substrate für die Keimung der Sporen sind. Eine Keimung in Wasser gelang BREFELD nur an überwintertem Sporenmateriale. ZELLNER (1910), der sich sehr eingehend mit der chemischen Zusammensetzung der Sporen dieses Pilzes befaßte, wies in ihnen insgesamt 24 verschiedene chemische Stoffe nach. Da sich darunter u. a. Fette, Eiweißkörper und Kohlenhydrate befinden, möchte man annehmen, daß die Sporen mindestens soviel Baustoffe selbst enthalten, um keimen und ein Promycel bilden zu können. Dafür spricht auch die Keimung in Erde. Da nun in Wasser normalerweise keine Keimung eintritt, ist zu vermuten, daß ein Mangel an Wirkstoffen diese hier verhindert. Dem stehen aber neuere Angaben entgegen, in welchen behauptet wird, daß es möglich ist, die Keimung in „synthetischer“ Nährlösung ohne Beigabe von Wirkstoffen herbeizuführen. Es handelt sich um Untersuchungen von RANKER (1930), VOLKONSKY (1934), BLUMER (1937), SCHOPFER und BLUMER (1938) und ITZEROTT (1938). VOLKONSKY erzielte Sporenkeimung, wenn er eine Grundnährlösung aus anorganischen Salzen (0,1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 g  $\text{MgCl}_2$ , einige Tropfen  $\text{Fe}_2\text{Cl}_6$  und 100 cm<sup>3</sup> aqua bidestill.) verwendete, der er als C-Quelle verschiedene Zucker (u. a. Xylose, Glucose, Maltose, Saccharose, Sorbit) und als N-Quelle Aminosäuren (Cystein, Alanin) oder Pepton zusetzte. Er stellte fest, daß die Zucker zwar die Keimung und Entwicklung günstig beeinflussen, aber nicht spezifisch wirken, da auch N-haltige, organische Verbindungen die Sporen zur Entwicklung des Promycels und der Konidien anregen. Über den Reinheitsgrad des Zuckers werden keine näheren Angaben gemacht. Die N-haltigen, organischen Verbindungen konnten durch  $\text{KNO}_3$  nicht ersetzt werden. BLUMER (1937) beobachtete ähnliches bei *Ustilago violacea*. Dieser Pilz kann Asparaginsäure besser ausnutzen als Ammoniumnitrat. Nach VOLKONSKY ist das Vorhandensein von Schwefel für die Entwicklung parasitischer Pilze unbedingt notwendig. *Ustilago zeae* kann seinen Schwefelbedarf aus S-haltigen Aminosäuren (Cystein) oder auch aus Sulfat ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) beziehen. Auch RANKER arbeitete mit „synthetischen“ Nährlösungen (nach SCHOPFER und BLUMER; die Arbeit selbst war uns leider nicht zugänglich). SCHOPFER und BLUMER nahmen für ihre Untersuchungen folgende Nährlösung: 100 cm<sup>3</sup> Aqua dest., 1 oder 2 g Glucose, 0,1 g Asparagin, 0,15 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,05 g  $\text{MgSO}_4$ . Der Zucker war zwar zweimal umkrystallisiert worden, doch ist es hier, ebenso wie in den früher genannten Arbeiten nicht exakt, von einer „synthetischen“ Nährlösung zu sprechen, da der Zucker nicht synthetisch hergestellt worden war. SCHOPFER und BLUMER erkannten die Bedeutung des Vitamins B<sub>1</sub> für die Keimung der Sporen mancher Ustilagineen und teilten diese danach in folgende Gruppen:



1. auxo-autotrophe Arten, die sich ohne Zusatz von Aneurin entwickeln;
2. fast vollständig auxo-autotrophe Art, die durch Aneurin oder Pyrimidin schwach gefördert wird (*Ustilago longissima*);
3. auxo-heterotrophe Art, die sich ohne Zusatz von Aneurin nicht entwickelt (*Ustilago violacea* f. sp. *dianthi deltooides*);
4. auxo-heterotrophe Art, die auf das ganze Aneurinmolekül angewiesen ist; bei Zusatz eines Gemisches von Pyrimidin und Thiazol erfolgt kein Wachstum (*Ustilago scabiosae*).

Zu der 1. Gruppe gehören u. a. *Ustilago zae*, *Ustilago avenae*, *Ustilago hordei*.

ITZEROTT (1938) nimmt an, daß das Wachstum in synthetischer Nährlösung deshalb möglich sei, weil der Pilz den für ihn ausschlaggebenden Wuchsstoff selbst aufbaue und durch Metallsalze den für ihn nötigen Co-Wuchsstoff bekomme. Diesem komme keine direkte Wuchsstoffwirkung zu, er verstärke nur den wachstumsfördernden Einfluß. Sie arbeitete mit einer „synthetischen“ Nährlösung, die folgende Zusammensetzung hatte: 5 g Dextrose, 0,27 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,4 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 1 Tropfen 2%ige wäßrige  $\text{FeCl}_3$ -Lösung, 100 cm<sup>3</sup> aqua dest. Dieser Nährlösung setzte sie später unter anderem auch noch wuchsstoffhaltige Extrakte aus Maiskoleoptilen oder Maisblättern sowie Heteroauxin zu. Die Extraktion aus Maiskoleoptilen und -blättern wurde nach den Angaben von K. RIPPEL (1936) und DAGYS (1937) ausgeführt. Sie stellte bei ihren Versuchen fest, daß ein Wuchsstoffgemisch, wie es in den Maiskoleoptilen und -blättern vorkommt, die Entwicklung des Pilzes sehr günstig beeinflusst. Außerdem wies sie nach, daß Heteroauxin in niedriger Konzentration ( $10^{-4}$ ) die Entwicklung des Pilzes besser förderte als in höheren Konzentrationen ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ). Die Auxine a und b können nach RONS DORF (1935) keinen Einfluß auf *Ustilago zae* in Nährlösungen haben, weil das leicht oxydierbare reine Auxin (KÖGL), wie sie meint, in der Nährlösung sofort unwirksam würde. LINK (1937) stellte fest, daß *Ustilago zae* in der Kulturflüssigkeit einen Stoff bildet, der mit Zusatz von  $\text{FeCl}_3$  eine Heteroauxinreaktion gibt.

Alle genannten Untersuchungen lassen die Frage ungeklärt, wieso Brandsporen trotz ihrem hohen Gehalt an Reservestoffen in Wasser nicht keimen. Zugewetzten Aminosäuren könnte man zwar diese spezifische Keimung-auslösende Wirkung zuschreiben, nicht aber dem Zucker. Es blieb also die Möglichkeit, daß der Zucker nicht als solcher, sondern durch Spuren von in ihm enthaltenen Wirkstoffen die Keimung auslöst.

Bei unseren Untersuchungen sollte daher festgestellt werden:

1. Wie die Sporen, die in Wasser nicht keimen, reagieren, wenn man diesem verschiedene Wirkstoffe zusetzt (Aminosäuren, Nicotinsäureamid, Heteroauxin, Vitamin B<sub>1</sub>);
2. sollte der Zucker für die SCHOPFER-Nährlösung einer näheren Untersuchung unterzogen werden;
3. sollte die Keimung der Sporen von *Ustilago zae* und zur Kontrolle von *Ustilago avenae* und *Ustilago hordei* in Maispflanzen- bzw. Haferpflanzenextrakt beobachtet werden.

## b) Methodik.

Um ausreichendes Sporenmaterial für unsere Versuche zu haben, wurden Maispflanzen (Sorte Pommernmais) mit Brandsporen, die in einer Nährlösung von Maisblättern gekeimt waren, infiziert. Wir erhielten so eine größere Anzahl frischer Brandbeulen. Die Sporenkeimungsversuche wurden im hängenden Tropfen oder in kleinen Petrischalen ( $d = 3$  cm) durchgeführt. Um bei möglichst konstanter Temperatur und unter Lichtabschluß zu arbeiten, wurden die Gefäße meist in einen Thermostaten mit  $28^\circ \pm 3^\circ \text{C}$  gestellt. Unter Keimung wird im folgenden die Ausbildung einer Basidie mit Konidien (Basidiosporen) verstanden. Als Kontrollnährlösung für die Keimfähigkeit diente 5%ige Bierwürze nach BREFELD. Zunächst wurde die Keimung in Leitungswasser und aqua dest. versucht. Dem Leitungswasser wurden dann die verschiedenen Aminosäuren (Cystin,  $\alpha$ -Alanin,  $\beta$ -Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Leucin), die uns freundlicherweise das chemische Institut der Universität zur Verfügung stellte, zugesetzt. Außerdem wurden noch Heteroauxin, Nicotinsäureamid „Riedel“, Vitamin B<sub>1</sub> (Betaxin) und Hefeextrakt angewandt. In einer weiteren Versuchsserie arbeiteten wir mit einer anorganischen Nährlösung, die nach den Angaben von HALBSGUTH (1949) hergestellt wurde, nämlich: 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,12 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,12 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 2 Tropfen off. Eisenchloridlösung, 1000 cm<sup>3</sup> aqua dest. Zu dieser Lösung wurden dann die verschiedenen Wirkstoffe (siehe oben) zugesetzt.

## c) Versuchsergebnisse.

1. Keimungsversuch in Leitungswasser ( $\text{pH } 7,4$ ) und aqua dest. ( $\text{pH } 6,5$ ). Die Versuche wurden im Licht und im Dunkeln bei einer Temperatur von  $22^\circ$  (im Licht) und  $28^\circ \text{C}$  (im Dunkeln) durchgeführt und 5 Tage lang beobachtet, ohne daß Keimung eintrat.

2. Bei den Kontrollversuchen in Bierwürze zeigte sich der normale Entwicklungsgang des Pilzes (Ausbildung von Basidie und Konidien).

In Hefeextrakt zeigte sich ebenfalls gute Entwicklung, 1% ige Hefenährlösung wirkte besser als 10% ige.

3. Leitungswasser mit einem Zusatz von Heteroauxin hatte die in Tab. 1 wiedergegebenen Ergebnisse.

Tabelle 1. *Ustilago zeae*. Keimung der Brandsporen in Leitungswasser mit Heteroauxin ( $\text{g/cm}^3$ ).

Konzentration	nach 12 Stunden	nach 24 Stunden	nach 48 Stunden	nach 72 Stunden
$10^{-4}$ . . . . .	—	—	—	—
$10^{-5}$ . . . . .	—	—	—	—
$10^{-6}$ . . . . .	—	(+)	+	++
$10^{-7}$ . . . . .	—	+	++	++

Es bedeutet: — keine Keimung, (+) bis 10% gekeimt, + bis 50% gekeimt, ++ 75% gekeimt.

Heteroauxin hatte also in der Konzentration  $10^{-6}$  und  $10^{-7}$  eine hohe keimungsfördernde Wirkung.

Um die Wirkung der Aminosäuren zu untersuchen, wurde dem Leitungswasser zunächst ein Gemisch der oben genannten zugesetzt. An

ihm zeigte sich gute Keimung (80%). Um festzustellen, welche die ausschlaggebende Aminosäure ist, wurden die Aminosäuren getrennt untersucht. Ferner wurden auch Versuche mit Vitamin B<sub>1</sub> durchgeführt.

Da Cystin in Wasser nicht löslich ist, wurde eine Aufschwemmung hiervon hergestellt. Es zeigt sich hierin die beste Keimung im Vergleich zu den anderen Aminosäuren (75%). Das mag daran liegen, daß Cystin schwefelhaltig ist und nach VOLKONSKY Schwefel einen wichtigen Wachstumsfaktor für *Ustilago zae* darstellt.

Tabelle 2. *Ustilago zae*. Keimung der Brandsporen in 1. Asparaginsäure, 2.  $\alpha$ -Alanin, 3.  $\beta$ -Alanin, 4. Leucin, 5. Glutaminsäure, 6. Nicotinsäureamid, 7. Vitamin B<sub>1</sub>.  
Diese Stoffe waren in den Konzentrationen 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-7</sup> zugesetzt worden.

Zusatzstoffe Konzentration	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
Asparaginsäure . . . . .	—	—	—	—	—	—	—
$\alpha$ -Alanin . . . . .	—	—	—	25%	—	—	—
$\beta$ -Alanin . . . . .	—	25%	25%	25%	—	—	—
Leucin . . . . .	—	—	—	—	—	—	—
Glutaminsäure . . . . .	—	25%	25%	25%	—	—	—
Nicotinsäureamid . . . . .	—	—	—	25%	30%	75%	75%
Vitamin B <sub>1</sub> . . . . .	—	—	15%	20%	—	—	—

Wie aus der Tab. 2 hervorgeht, hatte Nicotinsäureamid den weitaus größten Erfolg, und zwar in der gleichen Konzentration wie Heteroauxin, nämlich 10<sup>-6</sup> bis 10<sup>-7</sup>. Daneben hatten in bedeutend höherer Konzentration auch  $\beta$ -Alanin und Glutaminsäure eine gewisse Wirkung; die von Vitamin B<sub>1</sub> war sehr gering. Für die Entwicklung der Brandsporen von *Ustilago zae* ist also offenbar das Heteroauxin-Nicotinsäuresystem von ausschlaggebender Bedeutung. Beides sind Tryptophanabkömmlinge; das Heteroauxin entsteht über Indolbrenztraubensäure — Indolacetaldehyd, die Nicotinsäure über Kynurenin und 3-Hydroxyanthranylsäure; BEADLE, MITCHELL und NYC (1947) sowie MITCHELL und NYC (1948) fanden diese Zwischenprodukte bei *Neurospora*. Es ist sehr bemerkenswert, daß das gleiche Doppelsystem auch besonders günstigen Einfluß auf das Wachstum isoliert kultivierter Wurzelspitzen besitzt. Nach GALSTON (1949) wird durch Kombination von Indoleessig- und Nicotinsäure die Wurzelentwicklung von Erbsenepikotylen am Licht stark gefördert, das Wachstum von Spargelsproßspitzen dagegen im Dunklen gehemmt (GALSTON 1947). Die geringe Wirksamkeit des Vitamin B<sub>1</sub> war nach den Untersuchungen SCHOPFERS nicht überraschend. Offenbar besitzen die Maisbrandsporen dieses Vitamin in annähernd ausreichender Menge selbst. Es wäre indessen zu prüfen, wie sich die übrigen Ustilagineen verhalten, wenn ihnen wirkstofffreier Zucker zugesetzt wird.



In einer weiteren Versuchsreihe wurden der anorganischen Nährlösung von HALBSGUTH (1949) ebenfalls Glucose, Pepton, die oben genannten Aminosäuren, Heteroauxin, Nicotinsäureamid und Vitamin B<sub>1</sub> zugesetzt. Bei einem Zusatz von Glucose oder Pepton war eine gute Entwicklung zu verzeichnen (Basidie und Konidien). Die Ergebnisse mit Wirkstoffen unterschieden sich nicht von den Versuchen, in welchen nur Leitungswasser verwendet wurde.

SCHOPFER und BLUMER (1938) geben, wie schon erwähnt, an, ihre Versuche in synthetischer Nährlösung ausgeführt zu haben. Der Zucker, den sie für ihre Nährlösungen gebrauchten, war zwar zweimal umkristallisiert, aber nicht weiter gereinigt worden. Somit besteht die Möglichkeit, daß dieser Zucker noch Spuren von Wirkstoffen enthielt und daß diese die Keimung von *Ustilago zeae* ermöglichten. Um hierüber Klarheit zu bekommen, wurden Untersuchungen mit Glucose verschiedener Herkunft unternommen. Zunächst arbeiteten wir mit Traubenzucker in Ampullen (Deutsche Maizenawerke, Hamburg), weil dieser mindestens einmal umkristallisiert ist. In einer 10% igen Lösung (diese Konzentration erwies sich als optimal) war 50—75% ige Keimung zu verzeichnen. Daraufhin wurde die Zuckerlösung mit Chloroform und Äther ausgeschüttelt. Während nach der Behandlung mit Chloroform 50% ige Keimung auftrat, unterblieb die Keimung nach Behandlung mit peroxydfreiem Äther vollkommen. Hieraus folgt, daß nicht der Zucker selbst, sondern in ihm enthaltene ätherlösliche Wirkstoffe, vermutlich Heteroauxin, die Keimung auslösen. Um dies weiter zu verfolgen, wurden noch Versuche mit anders gewonnener Glucose angesetzt. Wir verwendeten „Holzzucker“ der Deutschen Bergin A. G. für Holzhydrolyse (Mannheim-Rheinau) und „Saccharum amylum“ von der chemischen Fabrik E. Merck (Darmstadt)<sup>1</sup>. Das Ergebnis war: I. Leitungswasser und 10% „Holzzucker“ — keine Keimung; II. Leitungswasser und 10% „Sacch. amyl.“ — keine Keimung. Nun setzten wir der SCHOPFERSchen Nährlösung die verschieden gewonnenen Zucker zu und erhielten folgendes Ergebnis.

I. Nährlösung + Handelsglucose	100% Keimung,
II. Nährlösung + Ampullenzucker	50—75% Keimung,
III. Nährlösung + mit Äther ausgeschüttelte Handelsglucose	10% Keimung,
IV. Nährlösung + mit Äther ausgeschüttelter Ampullenzucker	keine Keimung,
V. Nährlösung + Holzzucker	keine Keimung,
VI. Nährlösung + Sacch. amyl.	keine Keimung.

<sup>1</sup> Wir danken der Zellstoffabrik Waldhof für die freundliche Überlassung dieser Substanzen.

Aus diesen Versuchen ist klar ersichtlich, daß der Reinheitsgrad des Zuckers für die Keimung von *Ustilago zaeae* ausschlaggebend ist.

Den Nährlösungen, in denen keine Keimung aufgetreten war, wurde noch Heteroauxin  $10^{-6}$  und Vitamin B<sub>1</sub>  $10^{-4}$  zugesetzt. Bei Zusatz von Heteroauxin war eine 75—80% ige Keimung zu verzeichnen, während bei Zusatz von Vitamin B<sub>1</sub> wiederum nur Keimung bis zu 15% auftrat.

In weiteren Versuchen wurden der Nährlösung neben ungereinigter, keimungsauslösender Glucose noch verschiedene Hemmstoffe und Mitosegifte zugesetzt (Cumarin, 2,4-Dichlorphenoxyessigsäures Na, 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäures Na, sowie Colchicin, Trypaflavin, Rivanol und Chinosol).

Das Ergebnis war:

I. Nährlösung + Cumarin $10^{-3}$ bis $10^{-5}$	keine Keimung,
II. Nährlösung + 2,4-Dichlorphenoxyessigsäures Na $10^{-4}$	keine Keimung,
III. Nährlösung + 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäures Na $10^{-3}$ , $10^{-4}$	keine Keimung,
IV. Nährlösung + Colchicin $10^{-3}$ bis $10^{-5}$	keine Keimung,
V. Nährlösung + Trypaflavin 1 : 1000	keine Keimung,
VI. Nährlösung + Rivanol 1 : 1000	keine Keimung,
VII. Nährlösung + Chinosol 1 : 1000	keine Keimung,

Alle Stoffe verhinderten also die Keimung vollständig. Demnach müßte besonders Dichlorphenoxyessigsäure neben ihrer herbiciden auch eine für Getreide vorteilhafte fungicide Wirkung haben.

Bekannt ist, daß *Ustilago zaeae* nur *Zea Mays* befällt. Wie schon ITZEROTT (1938) angegeben hat, ist ein Maispflanzenextrakt für die Entwicklung von *Ustilago zaeae* sehr günstig. Es fehlt dagegen der Nachweis, ob es sich dabei um eine spezifische Wirkung handelt. Um darüber Klarheit zu gewinnen, kultivierten wir die Sporen nicht nur auf Extrakt von Maisblättern sondern auch auf Haferpflanzenextrakt. Die Extrakte wurden folgendermaßen hergestellt: 30 g 3 Wochen alte Mais- und Haferpflanzen wurden 15 min in 300 cm<sup>3</sup> Leitungswasser ausgekocht. Der Saft wurde filtriert und sterilisiert. Das Ergebnis war:

Maispflanzenextrakt	100%ige Keimung,
Haferpflanzenextrakt	10%ige Keimung.

Zur Kontrolle wurde außerdem noch die Keimung von *Ustilago avenae* und *Ustilago hordei* in diesen Extrakten untersucht. Es ergab sich:

#### 1. *Ustilago avenae*

Maispflanzenextrakt	25%ige Keimung,
Haferpflanzenextrakt	100%ige Keimung.

2. *Ustilago hordei*

Maispflanzenextrakt	20%ige Keimung,
Haferpflanzenextrakt	30%ige Keimung.

Daraus geht hervor, daß Maisblätter einen spezifischen keimungsfördernden Stoff für *Ustilago zeae* enthalten, wobei allerdings die Möglichkeit nicht ausgeschlossen wird, daß Hafer und auch andere Pflanzen einen diesen Pilz hemmenden Stoff besitzen. Da die Infektion der Maispflanzen direkt durch auf ihnen keimende Brandsporen erfolgen kann, ist anzunehmen, daß diese Spezifität dafür ausschlaggebend ist, daß solche Sporen andere Pflanzen nicht infizieren können.

2. Untersuchung der Basidiosporen von *Ustilago zeae* und *Ustilago avenae* in Mais- und Haferpflanzenextrakt.

Die Basidiosporen von *Ustilago zeae* kopulieren nach RAWITSCHER in der Wirtspflanze, in der sie zunächst eine Art Einkernmycel bilden; außerhalb der Pflanze ist es bisher noch nicht gelungen, die Basidiosporen zur Kopulation zu bringen. Es wurde nun eine Nährlösung hergestellt, von der angenommen wurde, daß sie ungefähr den Bedingungen in der Pflanze entsprach: 3 Wochen alte Maispflanzen wurden gewaschen, durch einen Wolf gedreht, zentrifugiert und filtriert. Die Lösung wurde dann an drei aufeinanderfolgenden Tagen 20 min im Dampftopf sterilisiert. In derselben Weise wurde auch ein Extrakt aus Hafer hergestellt. Die Weiterentwicklung beobachteten wir im hängenden Tropfen. Gleichzeitig wurden auch die Basidiosporen von *Ustilago avenae* untersucht, die außerhalb der Pflanze kopulieren. Wir erhielten dabei folgendes Ergebnis:

Eine Kopulation der Basidiosporen von *Ustilago zeae* trat nicht ein. Während sich aber im Maisextrakt die Basidiosporen gut vermehrten (100%), war die Vermehrung im Haferextrakt sehr gering (15—20%).

Im Haferextrakt kopulierten die Basidiosporen von *Ustilago avenae* 100%ig, dagegen im Maisextrakt nur bis zu 25%. Somit dürften auch für die Entwicklung der Basidiosporen spezifische Stoffe von Bedeutung sein. Die Kopulation der Basidiosporen des Haferbrandes wird durch den Maisextrakt offenbar gehemmt. Es ist anzunehmen, daß dies eine Erklärung dafür abgibt, daß die Basidiosporen verschiedener Ustilaginen nur bestimmte Wirtspflanzen zu infizieren vermögen.

## 3. Der Gallenwuchsstoff.

Es ist bekannt, daß sich an Pflanzenteilen, die von Pilzen befallen sind, größere Wuchsstoffmengen nachweisen lassen, als an normalen.

ZIMMERMANN untersuchte die verunstalteten Sprosse von *Euphorbia cyparissias* und fand in den Sproßspitzen und Knospen erhöhten Wuchsstoffgehalt. Auch bei



der Tumorbildung durch *Pseudomonas tumefaciens* spielt Heteroauxin eine Rolle (APPLER, 1951). Entsprechendes wurde auch an Pflanzenteilen beobachtet, die von tierischen Parasiten befallen sind. So ergaben sich erhöhte Wuchsstoffwerte an *Populus tremula*, wenn diese von Hexenbesen befallen ist, die hier durch eine Gallmücke (*Eriophyes dispar*) hervorgerufen werden. Dies beweist, daß der Schmarotzer dem Wirt nicht nur Nährstoffe entzieht, sondern daß durch den Befall auch eine Änderung im Wuchsstoffgehalt eintritt. Ob nun der Schmarotzer nur einen Reiz auf die Pflanze ausübt, der Wuchsstoffbildung zur Folge hat, oder ob er einen Stoff ausscheidet, der hierfür ausschlaggebend ist, bleibt unentschieden. LINK schreibt (1937): „The observation that fungi and bacteria that incite galls produce heteroauxin suggests the hypothesis that heteroauxin or other heteroauxones play important rolls in the production of galls by parasites. Studies are underway to determine wether *Erwinia amylovora*, *Phytophthora rhizogenes*, *Rhizobium phaseoli*, *Taphrina deformans*, or other species of *Taphrina*, and *Ustilago zae* produce heteroauxin or other heteroauxones in culture. Possibly mycorrhizal fungi serve their host by the formation of heteroauxones.“

LINK (1937) hatte die Bildung von Heteroauxin in den Gallen von *Ustilago zae* nachgewiesen, indem er die Extrakte nach der Eisenchlorid-Farbmethode prüfte. Von uns wurde die Bildung von Heteroauxin in *Ustilago zae* mit Hilfe des Avenatestes, der von ihm nicht durchgeführt wurde, überprüft. Zu diesem Zweck wurden die Beulen nach der Methode von LINSER (1939) mit heißem Alkohol extrahiert und an Haferkoleoptilen (Siegeshafer) nach der Methode von WENT (1928) getestet.

Die Testversuche wurden im Dunkelhaus bei einer Temperatur von 23° C ausgeführt. Die Extraktion wurde folgendermaßen durchgeführt: 10 g Maisbrandbeulen wurden mit 50 cm<sup>3</sup> Alkohol (96%) 2 Std lang am Rückflußkühler extrahiert. Der Rückstand wurde nochmals  $\frac{1}{4}$  Std lang mit Alkohol ausgezogen und abgedampft. Anschließend wurden zur Entfernung des Restalkohols 2,5 cm<sup>3</sup> Wasser zugesetzt und ebenfalls abgedampft. Der Rückstand wurde schließlich mit 2,5 cm<sup>3</sup> Wasser aufgenommen. 1 cm<sup>3</sup> Extrakt wurde mit der gleichen Menge 3%igem Agar zusammengeschmolzen. Auf einer Glasplatte 2,5 × 2,5 cm wurden 0,65 cm<sup>3</sup> dieser Mischung ausgegossen.

Zur näheren Identifizierung des Wuchsstoffes wurde der Extrakt mit dem Erbsenenzym von TANG und BONNER (1947) behandelt. Die Herstellung des Erbsenenzym erfolgte nach den Angaben der genannten Autoren in nachstehender Weise: Die Erbsen wurden angekeimt, eingetopft und im Dunkelhaus bis zu 5 cm wachsen gelassen. Ungefähr 5 g Erbsenepikotyle ließen wir  $\frac{1}{2}$  Std auf einer Eis-Kochsalzmischung bis — 8° gefrieren. In einem Mörser wurde das Gefrorene zerrieben und mit 50 cm<sup>3</sup> Wasser aufgenommen. 24 Std blieb diese Mischung bei einer Temperatur von + 4° C stehen. 1 cm<sup>3</sup> des zu untersuchenden Extraktes wurde mit 1 cm<sup>3</sup> Erbsenenzym 5 Std in den Thermostaten (35—39°) gestellt, dann mit Agar aufgenommen und getestet. Durch das Erbsenenzym wird Heteroauxin vernichtet oder wenigstens inaktiviert.

Der Extraktagar bewirkte nach 2½—3 Std eine negative Krümmung der Haferkoleoptile von durchschnittlich 15°. Der mit Erbsenenzym behandelte Extrakt ergab keinerlei Krümmung. Es wurde auch reines Sporenmaterial in Agar aufgenommen. Die Testung nach 5 Std ergab eine negative Krümmung von 10—13°.

Aus den Versuchen ergibt sich, daß in den reifen Beulen und in den Sporen von *Ustilago zaeae* ein Wuchsstoff aus der Auxingruppe vorkommt, der durch Erbsenenzym zerstört wird. Da das Erbsenenzym Heteroauxin spezifisch inaktiviert, muß es sich in den Beulen um dieses handeln. Dies würde mit den Untersuchungen von LINK übereinstimmen.

Es überrascht, daß die Brandsporen selbst Heteroauxin besitzen und trotzdem nur keimen, wenn man ihnen solches zusetzt. Man muß also annehmen, daß entweder die eigenen Heteroauxin-Mengen nicht ausreichen, oder daß dieser Stoff erst bei der Extraktion aktiviert (befreit) wird.

### Zusammenfassung.

Leitungswasser, in dem die Sporen von *Ustilago zaeae* nicht keimten, wurden verschiedene Stoffe (Aminosäuren, Heteroauxin, Nicotinsäureamid und Vitamin B<sub>1</sub>) zugesetzt, um zu prüfen, ob diese die Keimung beeinflussen. Die besten Wirkungen wurden mit Heteroauxin und Nicotinsäureamid erzielt, während Asparaginsäure und Leucin keinen Einfluß hatten.

Bei den Untersuchungen stellte sich weiter heraus, daß der Reinheitsgrad des verwendeten Zuckers bei der Keimung der Sporen von ausschlaggebender Bedeutung ist. Einige im Handel befindliche Glucose-sorten bewirken Keimung ohne Wirkstoffzusatz. Werden diese Zucker aber mit Äther gereinigt, so tritt keine Keimung mehr ein. Es werden wirkstofffreie Glucosepräparate angegeben. Die Versuche von SCHOPFER und BLUMER, bei denen Brandsporen-Keimung ohne Wirkstoffzugabe erfolgte, erklären sich offenbar aus der Verwendung ungereinigter Zucker.

Da die Brandsporen von *Ustilago zaeae* auf Maispflanzenextrakt, nicht aber auf Haferpflanzenextrakt, gut keimten, ist anzunehmen, daß *Zea Mays* einen keimungsauslösenden Stoff für sie enthält.

Die Kopulation der Basidiosporen außerhalb der Wirtspflanze in einem Extrakt aus Maisblättern gelang nicht, doch wurde nachgewiesen, daß sie sich hierin stark vermehrten, nicht aber in Haferpflanzenextrakt. Umgekehrt kopulierten Basidiosporen von *Ustilago avenae* nicht in Maisextrakt, wohl aber in Haferextrakt.

Es ist also anzunehmen, daß die spezifische Infektion einzelner Pflanzen durch bestimmte Brandpilze darauf beruht, daß die Wirtspflanzen spezifische keimungsfördernde Substanzen besitzen, die den andern Pflanzen fehlen. Möglicherweise verhindern solche auch durch Hemmstoffe die Keimung „artfremder“ Sporen.

Der Wuchsstoff der Gallen und Brandsporen ist Heteroauxin.

## Literatur.

- APPLER, H.: Biol. Zbl. **70**, 452 (1951). — BEADLE, G. W., H. K. MITCHELL u. J. NYC: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **33**, 155 (1947). — BLUMER, S.: Arch. Mikrobiol. **8**, 458 (1937). — BREFELD, O.: Untersuchungen aus dem Gesamtgebiet der Mycologie Bd. 5, Bd. 15 (1912). — DAGYS, J.: Protoplasma (Berl.) **28**, 205 (1937). — GALSTON, A. W.: J. of. Biol. Chem. **169**, 465 (1947). — HALBSGUTH, W.: Planta (Berl.) **36**, 551 (1949). — ITZEROTT, D.: Arch. Mikrobiol. **9**, 368 (1938). — LINK, G.: Bot. Gaz. **98**, 816 (1937). — LINSE, H.: Planta (Berl.) **29**, 392 (1939). — MITCHELL, H. K., u. J. NYC: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **34**, 1 (1948). — RANKER, E. R.: zitiert nach SCHOPFER u. BLUMER. — RAWITSCHER, F.: Z. Bot. **4**, 673 (1912). — RONS DORF, L.: Arch. Mikrobiol. **6**, 309 (1935). — RIPPEL, K.: Ber. dtsch. bot. Ges. **54**, 487 (1936). — SCHOPFER, W., u. S. BLUMER: Arch. Mikrobiol. **9**, 305 (1938). — TANG, Y. W., u. J. BONNER: Archives of Biochemistry **13**, 11 (1947). — VOLKONSKY, M.: Ann. Inst. Pasteur **52**, 76 (1934). — WENT, F. W.: Rec. Trav. Bot. Néerl. **25**, 1 (1928). — ZELLNER, J.: Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien. Math.-naturwiss. Kl. **116** (1910). — ZIMMERMANN, W. A.: Z. Bot. **30**, 209 (1936).



(Aus dem „Departamento de Micologia“ des „Instituto Botânico“, Lissabon.)

## Zur Kenntnis von *Torulopsis Pintolopesii* sp. nov.

Mit Beobachtungen über die parasitäre Phase  
von *Acladium Castellanii* Pinoy\*.

Von

N. VAN UDEN.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 21. Februar 1952.)

### Parasitäre Phase von *Acladium Castellanii* und Herkunft von *Torulopsis Pintolopesii*.

Der Erreger der nordamerikanischen Blastomykose, *Blastomyces dermatitidis* und der Erreger der südamerikanischen Blastomykose, *Paracoccidioides brasiliensis* haben, wie CONANT und HOWELL gezeigt haben, große Ähnlichkeit miteinander. Beide Arten haben im Gewebe sowie in Kultur bei 37° C die Form und die Wachstumsweise von Hefen; in Kultur bei Zimmertemperatur sind beide filamentös und zeigen weitgehende morphologische Übereinstimmung (makroskopisches Aussehen der Kultur; Form, Größe und Ansatzweise der Konidien u. a.); bei beiden Arten verwandelt sich die hefeähnliche in die filamentöse Form oder umgekehrt, je nach der Temperatur, welcher die Kultur ausgesetzt ist. CONANT und HOWELL haben deswegen beide Arten in einer Gattung, nämlich *Blastomyces*, untergebracht

Nun war uns aufgefallen, daß *A. Castellanii*, der Erreger der von CASTELLANI beschriebenen Akladiose, in Kultur bei Zimmertemperatur eine große Ähnlichkeit mit *B. dermatitidis* und *B. brasiliensis* aufweist (makroskopisches Aussehen der Kultur; Form, Größe und Ansatzweise der Konidien u. a.). Von der Arbeitshypothese ausgehend, daß *A. Castellanii* zur selben Gattung wie die Erreger der nord- und südamerikanischen Blastomykose gehören könnte, untersuchten wir einen Stamm (Nr. 2101, erhalten von CASTELLANI) dieses Pilzes auf sein Verhalten in Kultur bei 37° C und im Tierkörper.

Von einer 3 Wochen alten Kultur wurden Subkulturen auf verschiedenen Nährmedien gemacht (Sabouraudagar, Sabouraudagar mit 0,5% Fleischextrakt bzw. mit 0,5% Hefextrakt) und bei 37° C bebrütet. Der Pilz behielt jedoch unter diesen Wachstumsbedingungen den filamentösen Habitus bei und es konnte nicht die geringste Tendenz zu einem hefeartigen Wachstum beobachtet werden. Subkulturen, welche durch 6 Generationen in 2wöchigen Intervallen gemacht und auf den genannten Nährmedien bei 37° C wachsen gelassen wurden, zeigten ebenfalls nur die filamentöse Morphologie. Die Kolonien auf Sabouraudagar waren meist glatt, glänzend, cerebriform, gelb, von derber Konsistenz und sahen den Kolonien gewisser Stämme von *B. brasiliensis* mit geringer Neigung zu hefeartigem Wachstum bei 37° C (SALAZAR LEITE und RÉ) täuschend ähnlich.

\* Die Durchführung dieser Arbeit wurde durch die finanzielle Unterstützung des „Instituto Para A Alta Cultura“ (Lissabon) ermöglicht.

Eine bei 37° C auf Sabouraudagar gewachsene, 3 Wochen alte Kultur wurde in steriler, physiologischer Kochsalzlösung verrieben. Von der so erhaltenen Suspension spritzten wir 10 erwachsenen Mäusen je 1 cm<sup>3</sup> intraperitoneal ein. Die Tiere wurden nach 3 Wochen geopfert. Bei 6 Tieren fanden sich makroskopisch erkennbare pathologische Veränderungen vor. Unter der Dünndarm-, der Leber- und der Milzserosa, sowie im Innern des Leber- und Milzparenchyms befanden sich linsen- bis kleinerbsengroße, annähernd runde, ziemlich scharf begrenzte, graugelbe, derbe Herdchen, die nach Einscheiden einen dünnflüssigen, graugelben, mit käsigen Krümeln untermischten Eiter entleerten. In Kalilaugepräparaten dieser Herdchen gelangten lange, verzweigte, septierte, 2—3  $\mu$  breite Hyphen zur Beobachtung; hefeähnliche Zellen konnten wir auch hier nicht auffinden.

Von allen Tieren wurden normal aussehende Leber- und Milzteile sowie Material der Krankheitsherde entnommen und auf Sabouraudagar bei 37° C bebrütet. Nach ungefähr 14 Tagen waren um die meisten der Krankheitsherden entnommenen Inokula Pilzkolonien gewachsen, die sich als *A. Castellanii* identifizieren ließen. Das Wachstum in diesen Kolonien war gänzlich filamentös.

Dagegen waren in allen Röhren, die mit dem von 3 bestimmten Tieren stammenden Material (ausschließlich Leber- und Milzgewebe) beschickt worden waren, bereits nach 24 Std gänzlich aus Hefezellen bestehende Kolonien gewachsen. Von diesen 3 Tieren hatten sich nur bei einem die bereits beschriebenen pathologischen Veränderungen gezeigt (in der Milz); um das von diesen Veränderungen stammende Material traten auf Sabouraudagar ebenfalls diese Kolonien auf, aber nach einigen Tagen wurde außerdem an einer Stelle ein filamentöses Wachstum erkennbar, das sich zu einer typischen *A. Castellanii*-Kolonie entwickelte.

Mit der Möglichkeit rechnend, in diesen aus Hefezellen bestehenden Kolonien die parasitäre, hefeähnliche Phase von *A. Castellanii* gefunden zu haben, legten wir, in der Hoffnung, eine Umwandlung in die filamentöse Wachstumsweise beobachten zu können, Subkulturen auf Sabouraudagar bei Zimmertemperatur an. Die Subkulturen zeigten aber überraschenderweise keinerlei makroskopisch erkennbares Wachstum. Da sich in den Primärkulturen, die ja ebenfalls auf Sabouraudagar angelegt worden waren, die Ausdehnung der Kolonien auf die unmittelbare Umgebung der Inokula beschränkte, mußte an einen essentiellen Wachstumsfaktor (etwa ein Vitamin oder eine Aminosäure) gedacht werden, der wohl in den Leber- und Milzteilchen, jedoch nicht im Sabouraudagar vorhanden wäre. Subkulturen, die daraufhin auf Sabouraudagar mit Zusatz von 0,5% Fleischextrakt und 0,5% Hefeextrakt bei Zimmertemperatur angelegt wurden, gingen jedoch ebenfalls nicht an. Bei 37° C aber zeigten Subkulturen auf Sabouraudagar mit Fleisch- und Hefeextrakt bereits nach 24 Std eine gute Entwicklung, während auf dem zusatzlosen Sabouraudagar auch nach 3 Wochen Bebrütung noch kein Wachstum zu bemerken war.

Die Morphologie dieses Pilzes blieb in allen Subkulturen die einer Hefe, und auch in alten Kulturen (bis 3 Monate alt) konnte nie eine Umwandlung in die filamentöse Wachstumsweise beobachtet werden. Dies, im Verein mit den besonderen Ansprüchen dieses Pilzes in bezug auf Temperatur und Ernährung, ließ uns die Hypothese verwerfen, es mit der eventuellen parasitären, hefeähnlichen Phase von *A. Castellanii* zu tun zu haben.

*Es läßt sich somit sagen, daß der von uns untersuchte Stamm von Acladium Castellanii, im Gegensatz zu Blastomyces dermatitidis und B. brasiliensis, mit welchen Pilzen er in Kultur bei Zimmertemperatur große morphologische Ähnlichkeit hat, immer filamentös ist und weder in den Geweben der weißen Maus, wo er bedeutende pathologische Veränderungen hervorruft, noch in Kultur bei 37° C den Habitus einer Hefe annimmt.*

Die Hefe, die wir im Rahmen dieser Untersuchung von den Lebern und Milzen dreier mit *A. Castellanii* infizierten weißen Mäusen isolierten, stellt eine neue Art dar, für welche wir den Namen *Torulopsis Pintolopesii* vorschlagen. Ihre Beschreibung und systematische Einordnung soll anschließend vorgenommen werden.

### Eigenschaften von *T. Pintolopesii*.

#### *Der untersuchte Stamm.*

Für die Untersuchung bestimmten wir gänzlich willkürlich einen Stamm, der von der Leber desjenigen Tieres isoliert worden war, welches bei der Sektion pathologische Veränderungen gezeigt hatte. Um die Reinheit dieses Stammes sicherzustellen, wurde etwas Zellmaterial in sterilem Wasser suspendiert, ein Tropfen dieser Suspension in einer Petrischale mit geeignetem Nährmedium ausgestrichen und nach 24 Std eine gut isolierte Kolonie weitergezüchtet; diese Prozedur wiederholten wir 4mal.

*Sporenbildung.* Eine Bildung von Askosporen oder Basidiosporen (bzw. Ballistosporen) konnten wir nicht feststellen.

*Pseudomycel* trat ebenfalls nicht in Erscheinung.

*Ernährungsbedürfnisse.* Auf den folgenden von uns versuchten Nährböden vermag *T. Pintolopesii* nicht zu wachsen: Sabouraudagar (d-Glucose 4%, Pepton 1%, Agar 2%); Wasser mit 2% d-Glucose und 1% Pepton; Karotte (manchmal ein geringes Wachstum); Kartoffel; Kartoffelwasser. Ausgezeichnetes Wachstum erfolgt auf Sabouraudagar mit Zusatz von 0,5% Hefeextrakt (Difco) oder 0,5% Fleischextrakt (Difco). Bei einem Zusatz von 0,1% Hefeextrakt ist das Wachstum etwas geringer.

*T. Pintolopesii* braucht also für ihr Wachstum eine Substanz (oder vielleicht mehrere Substanzen), welche nicht in Pepton, wohl aber in Hefe- und Fleischextrakt vorhanden ist. Von dieser Substanz läßt sich zur Zeit nur sagen, daß sie thermostabil (wird sie doch bei der Sterilisierung des Nährbodens während 1/2 Std auf 120° C erhitzt) und wasserlöslich ist.



*Temperaturbedürfnisse.* Um Aufschluß über die Abhängigkeit des Wachstums von der Temperatur zu bekommen, züchteten wir die Hefe bei verschiedenen Temperaturen in einem flüssigen Nährmedium; das erfolgte Wachstum wurde dann nephelometrisch festgestellt. Das Nährmedium bestand aus Wasser mit 2% d-Glucose, 1% Pepton, 0,5% Hefeextrakt und 0,5% Fleischextrakt; es wurde in Mengen von 13 cm<sup>3</sup> in Reagensröhrchen abgefüllt. Nach 72 Std Bebrütung wurde der von der Hefe gebildete Bodensatz in Suspension gebracht und die Trübung mit einem photoelektrischen Colorimeter „Lameton“ gemessen. Die zu den verschiedenen Inkubationstemperaturen gehörenden Werte sind aus der Tab. 1 ersichtlich. Da die Zahlen die Lichtdurchlässigkeit der Suspension in Prozenten ausdrücken, sind sie um so niedriger, je stärker die Trübung und damit das Wachstum ist. (Die Zahlen der Tab. 1 sind niedriger als die der Tab. 2, weil unterschiedliche Nährlösungen verwendet wurden. Die Nährlösung der Tab. 1 war viel dunkler, so daß bereits der Nullwert niedriger lag; außerdem war sie nahrungshaltiger, so daß stärkeres Wachstum eintreten konnte.)

Tabelle 1. *Abhängigkeit des Wachstums von der Temperatur. Die Zahlen sind ein Maß für die Lichtdurchlässigkeit der Nährlösung mit der gewachsenen Hefe in Suspension. Mw. = Mittelwert.*

Nicht beimpft	25° C	26° C	27° C	28° C	30° C	37° C	40° C	41° C	42° C	45° C
48	48	48	45	24	14	16	15	44	43	44
49	49	48	43	24	15	16	16	45	44	46
49	47	49	45	23	15	16	14	46	46	44
48	49	48	45	23	17	16	14	45	43	43
48	47	47	46	23	15	16	15	44	44	44
48	48	48	45	23	15	16	16	46	44	45
Mw.	Mw.	Mw.	Mw.	Mw.	Mw.	Mw.	Mw.	Mw.	Mw.	Mw.
48,3	48	48	44,8	23,3	15,2	16	15	45	44	44,3

Es ergab sich somit, daß *T. Pintolopesii* über 40° C und unter 28° C nicht zu wachsen vermag; zwischen 30° und 40° C ist das Wachstum gleichmäßig gut; wenn die Temperatur von 30° auf 27° C gesenkt wird, nimmt das Wachstum von maximal auf null ab.

Es trat unter unseren Versuchsbedingungen keine eigentliche Optimaltemperatur in Erscheinung. Man beachte, daß die Temperaturspanne sehr klein ist; dies dürfte mit der genotypisch festgelegten Anpassung von *T. Pintolopesii* an die Körpertemperatur der Maus in Zusammenhang stehen.

*Mikroskopische Morphologie.* Nach 24 Std Wachstum bei 35° C in einer Nährlösung mit 2% d-Glucose, 1% Pepton und 0,1% Hefeextrakt findet man ovale, (4—5) × (5—7)  $\mu$  messende Zellen, welche kleinere und größere, meist verzweigte Sproßverbände bilden (Abb. 1). Die Verzweigung der Sproßverbände zeigt, daß multipolare Sprossung vorliegt. Nach längerer Wachstumszeit (2—3 Tagen) in dieser Nährlösung treten auch runde Zellen auf; sonst tritt keine Änderung der Morphologie ein. Nach 3 Tagen Wachstum bei 35° C auf Sabouraudagar mit Zusatz von

0,5% Hefeextrakt findet man ovale und runde,  $(4-6) \times (5-8) \mu$  messende Zellen, welche einzeln, zu zweien oder in kleinen Sproßverbänden auftreten. Manche Zellen besitzen eine stark lichtbrechende, bis  $0,7 \mu$  messende Membran; wenige dieser Zellen, und zwar runde, haben einen Durchmesser bis zu  $15 \mu$ .

**Makroskopische Morphologie.** In einer Nährlösung mit 2% d-Glucose, 1% Pepton und 0,1% Hefeextrakt bilden sich bereits in den ersten 24 Std ein Bodensatz und ein ganz dünner Wandbelag. Eine Haut oder ein Ring werden auch später nicht gebildet und Trübung tritt ebenfalls nicht ein. Nach 30 Tagen Wachstum bei  $35^\circ \text{C}$  auf Sabouraudagar mit Zusatz von 0,5% Hefeextrakt ist die Strichkultur cremefarbig, weich, glänzend, glatt, an den Rändern oft leicht gekräuselt.

**Alkoholgärung.** Für den Nachweis der Gasbildung verwendeten wir die Methode von LANGERON und GUERRA in der Modifikation von PEREIRO MIGUENS. Da wir die Versuche bei  $35^\circ \text{C}$  vornahmen, mußte das Paraffinöl in der Paraffin-Paraffinölmischung reduziert werden (10 Tropfen auf 30 g Paraffin), weil sonst die Mischung zu weich wurde. Zur Kontrolle prüften wir die Gasbildung auch mit Durhamröhrchen und erhielten damit dieselben Ergebnisse. Die Nährlösung enthielt 1% Pepton, 0,1% Hefeextrakt und 2% des jeweiligen Zuckers. Nach 5 Tagen Inkubation bei  $35^\circ \text{C}$  wurde die Gasbildung festgestellt. Wenn sich nach 24 Tagen noch keine Gasbildung feststellen ließ, wurde auf Abwesenheit des Vermögens zur Gasbildung geschlossen.

Es ergab sich, daß d-Glucose von *T. Pintolopesii* vergoren wird, während d-Galaktose, Saccharose, Maltose und Lactose von dieser Hefe nicht vergoren werden.

**C-Assimilation.** Zur Prüfung des Vermögens, verschiedene Zucker als Kohlenstoffquelle zu verwenden, bedienten wir uns zunächst einer kohlenstofffreien Nährlösung mit Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle (Ammoniumsulfat 0,5%, Kaliumbiphosphat 0,1%, Magnesiumsulfat 0,05%). Den besonderen Ernährungsbedürfnissen von *T. Pintolopesii* entsprechend mußte dieser Nährlösung noch 0,04% Hefeextrakt zugesetzt werden. Die zu untersuchenden Zuckerarten, d-Glucose, d-Galaktose, Saccharose, Maltose und Lactose, wurden dieser Nährlösung einzeln in Konzentrationen von 2% zugesetzt. Diese verschiedenen Nährlösungen sowie die Nährlösung ohne Zuckerzusatz wurden in Mengen von  $13 \text{ cm}^3$  in Reagensröhrchen abgefüllt. Nach 5 Tagen Wachstum bei  $35^\circ \text{C}$  wurde das Resultat nephelometrisch festgestellt. Nur in den Röhrchen mit d-Glucose als Kohlenstoffquelle erfolgte ein deutliches Wachstum. Wir schlossen daraus, daß d-Glucose von *T. Pintolopesii* verwendet wird, die anderen untersuchten Zuckerarten jedoch nicht. Da in den Röhrchen mit der zuckerlosen Nährlösung kein Wachstum erfolgte, schlossen wir ferner, daß der zugesetzte Hefeextrakt praktisch nicht als Kohlenstoffquelle für *T. Pintolopesii* in Frage kommt und somit das Vorhandensein dieses Zusatzes

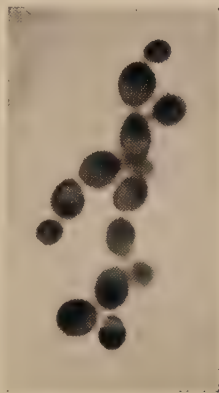


Abb. 1.

Verzweigter Sproßverband aus einer 24 Std alten Kultur in einer Nährlösung (s. Text) bei  $35^\circ \text{C}$ . von *T. Pintolopesii*. Anilinblaufärbung. Mikrophotographie. Vergr.  $\pm 1400$  fach.

den Wert der Ergebnisse nicht herabmindern kann. Als wir dann später die Stickstoffassimilation (siehe unten) untersuchten, stellte sich heraus, daß Ammoniumsulfat nicht als Stickstoffquelle verwendet wird. Da wir aber diese Verbindung bei der Prüfung der Kohlenstoffassimilation verwendet hatten, mußten wir schließen, daß in Wirklichkeit nur der Hefeextrakt als Stickstoffquelle verwendet worden war. Eine Wiederholung der Versuche unter Weglassung des Ammoniumsulfats führte zu denselben Ergebnissen. Die abgelesenen Werte sind aus der Tab. 2 ersichtlich.

Tabelle 2. *N- und C-Assimilation. Die Zahlen sind ein Maß für die Lichtdurchlässigkeit der Nährlösung mit der gewachsenen Hefe in Suspension. Mw. = Mittelwert. n.b. = nicht beimpft.*

Dextrose 2%, Hefeextrakt 0,04% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1%, MgSO <sub>4</sub> 0,05%, dest. Wasser 100						Hefeextrakt 0,04%, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1%, MgSO <sub>4</sub> 0,05%, dest. Wasser 100						
+ KNO <sub>3</sub> 0,8%	+ (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,6%	+ Harnstoff 0,25%	+ Asparagin 0,6%	+ Pepton 1%	Ohne Zusatz	+ d-Glucose 2%	+ d-Galak- tose 2%	+ Saccharose 2%	+ Maltose 2%	+ Lactose 2%	+ Äthyl- alkohol 3%	Ohne Zusatz
70	70	71	76	46	70	72	91	86	80	94	94	94
70	69	71	80	46	72	68	92	87	81	92	93	95
70	72	70	79	47	71	70	91	86	81	96	93	94
73	70	70	78	45	71	68	90	86	82	95	93	94
71	70	68	78	46	69	71	91	87	80	94	92	94
69	69	68	78	46	72	70	91	87	81	93	93	94
Mw.	Mw.	Mw.	Mw.	Mw.	Mw.	Mw.	Mw.	Mw.	Mw.	Mw.	Mw.	Mw.
70,5	70	69,7	78,2	46	70,8	69,8	91	86,5	80,8	94	93	94,1
n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
98	98	98	98	92	98	98	98	98	90	98	98	98

Es ergab sich somit, daß d-Glucose von *T. Pintolopesii* als Kohlenstoffquelle verwendet wird, d-Galaktose, Saccharose, Maltose und Lactose dagegen nicht.

Das äußerst geringe Wachstum mit Saccharose und Maltose kann für praktische Klassifikationszwecke unberücksichtigt bleiben. Ob hier wirklich eine, wenn auch äußerst geringe Verarbeitung dieser Zucker vorgelegen hat, läßt sich ohne weitere Untersuchungen nicht sagen, da z. B. eine teilweise Hydrolyse dieser Zucker bei der Sterilisation stattgefunden haben mag. Ferner ist zu beachten, daß bei Maltose bereits der Nullwert (90) niedriger war.

*N-Assimilation.* Das Vermögen, Kaliumnitrat, Ammoniumsulfat, Harnstoff, Asparagin und Pepton als Stickstoffquellen zu verwenden, prüften wir in ähnlicher Weise wie die Kohlenstoffassimilation. Die Grundnährlösung enthielt folgende Substanzen: d-Glucose 2%, Kaliumbiphosphat 0,1%, Magnesiumsulfat 0,05%, Hefeextrakt 0,04%. Die Konzentrationen der zugesetzten Stickstoffquellen und die nach 5 Tagen Wachstum bei 35° C abgelesenen Werte sind aus der Tab. 2 ersichtlich.

Da Hefeextrakt von *T. Pintolopesii* als Stickstoffquelle verwendet wird, erfolgte in allen Röhren ein deutliches Wachstum. Nur ein einwandfreies Mehrwachstum in den Röhren mit Zusatz einer der geprüften Substanzen konnte als Beweis genommen werden, daß die Hefe die betreffende Substanz als Stickstoffquelle benützt. Dies war nur in den Röhren mit dem Peptonzusatz der Fall.



Es ergab sich somit, daß Pepton als Stickstoffquelle von *T. Pintolopesii* verwendet wird, Kaliumnitrat, Ammoniumsulfat, Harnstoff und Asparagin dagegen nicht.

Man beachte, daß in den Röhren mit Asparagin das Wachstum geringer war als in den zusatzlosen Röhren. Dieser interessante Befund mag zu den Ergebnissen von HARTELIUS — zitiert nach LILLY und BARNETT — in Beziehung stehen. HARTELIUS fand nämlich, daß das Wachstum eines Hefestammes u. a. von Asparagin gehemmt wurde, wenn suboptimale Mengen von  $\beta$ -Alanin im Nährmedium vorhanden waren.

*Äthylalkoholverwertung.* Mit Äthylalkohol als einzige Kohlenstoffquelle erfolgte kein Wachstum. Die angewandte Technik war dieselbe wie für die Prüfung der Zuckerassimilation. Die abgelesenen Werte sind aus der Tab. 2 ersichtlich.

*Carotinoide Pigmente.* Nachweisversuche von carotinoiden Pigmenten mit der Methode von MOLISCH — zitiert nach LODDER (S. 36) — verliefen negativ.

*Pathologie.* Die Heterotrophie von *T. Pintolopesii* in bezug auf eine Substanz, welche im Leber- und Milzgewebe der weißen Maus, jedoch nicht in Pepton vorhanden ist, gemeinsam mit der Tatsache, daß bei der Körpertemperatur der weißen Maus maximales Wachstum, unter 28° C jedoch kein Wachstum erfolgt, läßt es als fast sicher erscheinen, daß *T. Pintolopesii* ein obligater Parasit der weißen Maus und möglicherweise auch anderer Warmblüter ist.

Die Temperaturspanne des Pilzes (28—40° C) stimmt gut überein mit der Temperaturspanne mancher menschenpathogenen Mikroorganismen, wie des *Meningococcus* (25—42° C), des *Gonococcus* (30—39° C), des *Mycobacterium tuberculosis* (29—43° C); „eine ähnliche kleine Spanne zeigen viele pathogene, an die Körpertemperatur der Warmblüter angepaßte Formen“ (RIPPEL-BALDES, S. 138). Allerdings vermag *T. Pintolopesii* sich bei Zimmertemperatur längere Zeit lebend zu erhalten. Kulturen, die 3 Monate lang bei Temperaturen zwischen 10 und 20° C aufgehoben worden waren, enthielten, wie gelungene Subkulturen bewiesen, noch lebendes Zellmaterial. Es ist somit die Möglichkeit gegeben, daß eine *T. Pintolopesii*-Infektion mit Zellen erfolgen kann, die schon seit längerer Zeit den Wirtsorganismus verlassen haben.

Über die Klinik, pathologische Anatomie, Übertragung usw. der *T. Pintolopesii*-Infektion sowie über die Frage, welche Lebewesen von ihr befallen werden können, läßt sich zur Zeit nichts sagen; einige Inokulationsversuche, welche wir an Meerschweinchen vornahmen, sind ergebnislos verlaufen.

### Systematische Stellung und Umgrenzung von *T. Pintolopesii*.

Da *T. Pintolopesii* weder Askosporen noch Basidiosporen (Ballistosporen) bildet und die Morphologie einer Hefe besitzt, gehört sie zur Gruppe der *asporogenen Hefen*.

Diese Gruppe bildet in der Einteilung von BUCHWALD — zitiert nach DIDDENS und LODDER, S. 12 — die Ordnung der *Torulopsidales*, welche zu den *Fungi imperfecti*

gehört. Nach LODDER und nach DIDDENS und LODDER wird diese Ordnung von zwei Familien aufgebaut: den *Rhodotorulaceae* und den *Torulopsidaceae*. Die erstgenannte Familie unterscheidet sich von der zweiten durch die Bildung carotinoider Pigmente. Da *T. Pintolopesii* keine carotinoiden Pigmente bildet, gehört sie zur Familie der *Torulopsidaceae*. Die Hefen dieser Familie, die Pseudomycel bilden, bauen die Unterfamilie der *Mycotoruloideae* auf, diejenigen, die keins bilden — somit auch *T. Pintolopesii* — stellen die Unterfamilie der *Torulopsidoideae* dar mit den 7 Gattungen: *Torulopsis*, *Pityrosporum*, *Mycoderma*, *Kloeckera*, *Asporomyces*, *Trigonopsis* und *Schizoblastosporion*.

*T. Pintolopesii* mußte folgender Eigenschaften wegen in der Gattung *Torulopsis* BERLESE em. LODDER (S. 180) untergebracht werden: Die Zellen sind oval oder rund, die Knospung ist multipolar, in flüssigen Nährmedien wird ein Bodensatz, aber keine Haut gebildet, d-Glucose und Pepton werden assimiliert.

Von LODDER wurden innerhalb dieser Gattung 22 Arten und 2 Varietäten anerkannt. *T. Pintolopesii* unterscheidet sich von diesen Arten und Varietäten durch ihre Temperaturspanne und ihre Abhängigkeit von einem Wachstumsfaktor, der nicht in Pepton vorhanden ist.

Die *Torulopsis*-arten zerfallen in 2 Gruppen: die der vergärenden und die der nichtvergärenden Arten. *T. Pintolopesii* vergärt d-Glucose, gehört somit zur 1. Gruppe. Innerhalb dieser Gruppe wurden von LODDER 2 Arten und eine Varietät anerkannt, die, wie *T. Pintolopesii*, nur d-Glucose vergären. Es sind dies *T. pulcherrima* (LINDNER) SACCARDO, *T. pulcherrima* var. *variabilis* LODDER und *T. Molischiana* (ZIKES) LODDER<sup>1</sup>.

*T. pulcherrima* und die Varietät *variabilis* unterscheiden sich von *T. Pintolopesii* durch ihr gutes Wachstum bei Zimmertemperatur, ihre Unabhängigkeit von in Pepton nicht vorhandenen Wachstumsfaktoren, die Bildung eines Ringes und einer schleimigen Haut in flüssigen Nährmedien, die Bildung eines roten Pigments bei Anwesenheit einer Spur Eisen, die Assimilation von Ammoniumsulfat, Harnstoff und Asparagin. Außerdem bildet *T. pulcherrima*, wie WINDISCH sowie DIDDENS und LODDER neuerdings feststellten, Pseudomycel, so daß sie, samt der Varietät *variabilis* in die Gattung *Candida* übergeführt werden mußte.

*T. Molischiana* unterscheidet sich von *T. Pintolopesii* durch ihr gutes Wachstum bei Zimmertemperatur, ihre Unabhängigkeit von in Pepton nicht vorhandenen Wachstumsfaktoren, die geringere Größe der Zellen, die Schleimhülle der Zellen, die fehlende Anordnung der Zellen in grö-

<sup>1</sup> Anmerkung bei der Korrektur. Frau Dr. J. LODDER hat uns auf die Existenz von *Cryptococcus glabratus* aufmerksam gemacht. Diese Hefeart, welche ebenfalls nur Glucose vergärt und assimiliert, wurde von ANDERSON (J. Inf. Dis. 21, 341, 1917) beschrieben und von LODDER (Mycopathologia 1, 98, 1937) in die Gattung *Torulopsis* gebracht. „*T. Pintolopesii* unterscheidet sich jedoch deutlich von *T. glabrata* durch die eigentümliche Thermophilie und durch das Biosbedürfnis“ (LODDER: Persönliche Mitteilung). Frau Dr. J. LODDER hat freundlicherweise eine Kultur von *T. Pintolopesii* nachuntersucht und unsere Ergebnisse bestätigt. Es sei ihr dafür an dieser Stelle bestens gedankt.

beren Sproßverbänden, die Bildung eines Ringes in flüssigen Nährmedien, die schleimige Konsistenz der Strichkultur. (Was die Eigenschaften von *T. pulcherrima* und von *T. Molischiana* betrifft, stützen wir uns auf die Beschreibung von LODDER.)

Es ergibt sich somit, daß der untersuchte Hefestamm zur Gattung *Torulopsis* gehört, jedoch nicht in einer der bekannten Arten dieser Gattung untergebracht werden kann. Er stellt somit den Vertreter einer neuen Art dar, für welche wir bereits eingangs den Namen *Torulopsis Pintolopesii* vorschlugen. Die Umgrenzung dieser neuen Art folgt anschließend.

### *Torulopsis Pintolopesii* sp. nov.

Cellulae ovoideae vel globosae  $(4-5) \times (5-7) \mu$ , binae aut singulares, sed communiter in catenis ramosis. Crescit tantum inter 28 et 40° C. Indiget factore ad crescendum in extracto levedinis non in peptono existente. Sedimentum formatur in medio liquido cum dextroso et peptono et extracto levedinis, anulus pelliculae non oriuntur. Fermentat dextrosam, non vero galactosum, saccharum, maltosum, lactosum. Assimilat dextrosam, non vero galactosum, saccharum, maltosum, lactosum neque alcohol aethylicum. Nitras kalii, sulfas ammonii, ureum, asparaginum non assimilantur, peptonum vero assimilat. Cultura in agar cum dextroso et peptono et extracto levedinis post unum mensem sub 35° C apparet flavido-alba, mollis, nitens, glabra, margineque saepe sublobata.

Habitat: In hepate et liene *Muris musculi* L., formae albae, Olissipone.

Zellen oval oder rund,  $(4-5) \times (5-7) \mu$ , einzeln oder zu zweien, aber meist in verzweigten Sproßverbänden. Wächst nur zwischen 28 und 40° C. Braucht einen Wachstumsfaktor, der in Hefeextrakt, aber nicht in Pepton enthalten ist. In Nährlösung mit d-Glucose, Pepton und Hefeextrakt bildet sich Bodensatz, Ring oder Haut werden nicht gebildet. Fermentiert d-Glucose, aber nicht d-Galaktose, Saccharose, Maltose und Lactose. Assimiliert d-Glucose, aber nicht d-Galactose, Saccharose, Maltose, Lactose und Äthylalkohol. Assimiliert Pepton, aber nicht Kaliumnitrat, Ammoniumsulfat, Harnstoff und Asparagin. Strichkultur auf Agar mit d-Glucose, Pepton und Hefeextrakt nach 1 Monat bei 35° C, cremefarbig, weich, glänzend, glatt, oft mit leicht gekräuseltem Rand.

Habitat: In Leber und Milz von Albinos von *Mus musculus* L. in Lissabon.

Als Typus dieser Art nehmen wir den untersuchten Stamm. Dieser Stamm wird im „Departamento de Micologia“ des „Instituto Botânico“ zu Lissabon unter der Nummer 2405 in Kultur gehalten. Eine Subkultur wurde bei der Hefeabteilung des „Centraalbureau voor Schimmelcultures“ zu Delft deponiert.

### Zusammenfassung.

Bei 6 von 10 weißen Mäusen, die intraperitoneal mit *Acladium Castellani* geimpft worden waren, zeigten sich nach 3 Wochen Abscesse in Leber, Milz und Dünndarm. In den Krankheitsherden und in Kulturen bei 37° C zeigte der untersuchte Stamm nicht einen hefeähnlichen, sondern einen filamentösen Habitus; hierin unterscheidet sich *A. Castellani* von *Blastomyces dermatitidis* und *B. brasiliensis*, mit welchen Pilzen *A. Castellani* in Kultur bei Zimmertemperatur große Ähnlichkeit hat.



Von Leber und Milz dreier weißen Mäuse, die mit *A. Castellanii* infiziert worden waren, wurde eine neue Hefe isoliert, für welche der Name *Torulopsis Pintolopesii* vorgeschlagen wird. *T. Pintolopesii* wächst nur zwischen 28 und 40° C und braucht einen thermostabilen, wasserlöslichen Wachstumsfaktor, der im Leber- und Milzgewebe der weißen Maus, in Hefeextrakt und in Fleischextrakt, jedoch nicht in Pepton vorhanden ist. Auf Sabouraudagar mit Zusatz von 0,5% Hefeextrakt erfolgt gutes Wachstum. *T. Pintolopesii* bildet keine Askosporen, keine Basidiosporen (Ballistosporen), kein carotinoides Pigment, kein Pseudomycel. Die Zellen zeigen multipolare Sprossung, sind oval oder rund und haben eine starke Neigung zur Bildung von großen Sproßverbänden (Abb. 1). In flüssigen Nährmedien wird nur Bodensatz gebildet, Ring- und Hautbildung, sowie Trübung bleiben aus. Die Strichkultur ist cremefarbig, weich, glänzend und glatt, an den Rändern oft leicht gekräuselt. Von den untersuchten Kohlenstoffquellen (d-Glucose, d-Galaktose, Saccharose, Maltose, Lactose und Äthylalkohol) wird nur d-Glucose verwendet (Tab. 2). d-Glucose wird vergoren. Von den untersuchten Stickstoffquellen (Kaliumnitrat, Ammoniumsulfat, Harnstoff, Asparagin und Pepton) wird nur Pepton verwendet (Tab. 2). Asparagin zeigte unter den Versuchsbedingungen des Verfassers eine hemmende Wirkung auf das Wachstum von *T. Pintolopesii* (Tab. 2).

### Literatur.

- BUCHWALD, N. F.: Fungi imperfecti (Deuteromycetes). Kopenhagen 1939. — CASTELLANI, A.: Brit. Med. J. **2**, 486 (1916); Anais do Instituto de Medicina Tropical **6**, 477 (1949). — CONANT, N. F., and ARDEN HOWELL: J. Invest. Dermat. **5**, 353 (1942). — DIDDENS, H. A., u. J. LODDER: Die anaskosporogenen Hefen. Zweite Hälfte. Amsterdam: N. V. Noord-Hollandsche Uitgevers Maatschappij 1942. — HARTELIUS, V.: Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. physiol. **24**, 185 (1946). — LANGERON, M., et P. GUERRA: Ann. de Parasitol. **16**, 36 (1938). — LILLY, V. G., and H. L. BARNETT: Physiology of the Fungi. S. 239. New York, Toronto, London: McGraw-Hill Book Company, Inc. 1951. — LODDER, J.: Die anaskosporogenen Hefen. Erste Hälfte. Amsterdam: N. V. Noord-Hollandsche Uitgevers Maatschappij 1934. — MOLISCH, H.: Mikrochemie der Pflanze. S. 250. Jena 1921. — PEREIRO MIGUENS, MANUEL: Actas Dermo-sifiliograficas **41**, 89 (1949). — RIPPET-BALDES, A.: Grundriß der Mikrobiologie. Zweite Auflage. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer-Verlag 1952. — SALAZAR LEITE, A., e LUIS RÉ: Anais do Instituto de Medicina Tropical **8**, 27 (1951). — WINDISCH, S.: Arch. f. Mikrobiol. **11**, 368 (1940).

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

## Über das scheinbare Versagen des Tetrazoliumtestes bei *Bacterium coli*.

Von

HEINZ STOLP.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 1. März 1952.)

Von WALLHÄUSSER (1950) wurde darauf hingewiesen, daß mit den gebräuchlichsten Plattentestmethoden, dem Zylinder- und Lochtest, Antibiotica nur in ihrer Wirkung auf auskeimende Testorganismen geprüft werden können. Über den Einfluß eines Stoffes auf ältere Keime sind bei Anwendung dieser Methoden keine Aussagen zu machen. Das Auftreten einer sichtbaren Hemmzone ist bei einer schon bewachsenen Platte nur dann zu erwarten, wenn der Testorganismus unter der Wirkung der zu prüfenden Substanz der Autolyse unterliegt, was aber nur in den seltensten Fällen zutrifft. Obwohl einige bakteriolytisch wirkende antibiotische Substanzen vorkommen, haben wir es bei der Mehrzahl der Antibiotica bekanntlich mit stark bakteriostatisch und nur schwach bactericid und nicht lytisch wirkenden Stoffen zu tun. Durch Anwendung von Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) konnte WALLHÄUSSER mit *Bacillus mycoides* als Testorganismus normalerweise nicht sichtbare Hemmzonen „entwickeln“. Die nicht geschädigten Bakterien verursachten durch Reduktion von TTC in kürzester Zeit eine intensive Rotfärbung, während im Bereich eines wirksamen Hemmstoffes die Formazanbildung ausblieb. Es konnte mit dieser Methode außerdem gezeigt werden, daß die mit TTC sichtbar gemachten Hemmzonen oft bedeutend größer sind als normal sichtbar, sofern es sich um den üblichen Test auf auskeimende Organismen handelt.

Erfahrungsgemäß sind die meisten gram-positiven Bakterien gegen Antibiotica empfindlicher als gram-negative, wenn auch einige Ausnahmen dieser Regel entgegenstehen. Aus diesem Grunde haben die gegen gram-negative Organismen wirksamen Substanzen besondere Bedeutung erlangt. Als Testorganismus wird vielfach *Bacterium coli* benutzt.

Bei eigenen Untersuchungen wurde nun die Beobachtung gemacht, daß der von WALLHÄUSSER vorgeschlagene Test bei *B. coli* nicht anwendbar ist, weil sich Coli-Keime nach einem Alter von etwa 10 Std auf einem Bouillon-Nährboden nicht mehr anfärben. Es gelang durch Abänderung der Methodik, das Reduktionsvermögen von *B. coli* zu aktivieren und damit eine Anfärbung und Abgrenzung von Hemmzonen auch bei den über die ganze Fläche gleichmäßig bewachsenen Platten zu erreichen.

Von anderer Seite wurde schon darauf hingewiesen, daß verschiedene Bakterien auf Tetrazoliumsalze sehr unterschiedlich reagieren. Die Verhältnisse wurden von BIELIG u. Mitarb. näher untersucht. Es hat sich dabei herausgestellt, daß einige

Stämme TTC mehr oder weniger stark reduzierten und daß bei anderen (z. B. *Streptokokken*) überhaupt keine Rotfärbung zu beobachten war. Bei verschiedenen Stämmen trat erst nach einigen Tagen Rötung auf, während andere bereits nach wenigen Minuten gut erkennbare Formazanbildung aufwiesen. Mit zunehmendem Alter nahm die Zahl der elektiv gefärbten Keime ab. Bei Einwirkung von TTC auf eine 24 Std alte Kultur von *B. coli* ließen nur noch 50% der Keime mikroskopisch Formazanbildung erkennen. WALLHÄUSSER konnte dagegen bei *Bac. mycoides* noch nach 48 Std eine intensive Rotfärbung feststellen, die erst im Alter von etwa 60 Std merklich nachließ. Eigene Untersuchungen in dieser Richtung führten zu ganz ähnlichen Ergebnissen.

Daß Bakterien in einem bestimmten Alterszustand das TTC nicht mehr reduzieren, liegt daran, daß der Stoffwechsel durch Verbrauch der Nährstoffe oder Anreicherung hemmender Stoffwechselprodukte zum Stillstand kommt. Nichtreduzierende Bakterien brauchen deshalb nicht tot zu sein.



Abb. 1.

Abb. 1. Oben: Streptomycin. Unten: Sublimat. (Erklärung im Text.)



Abb. 2.

Abb. 2. Wie bei Abb. 1. (Erklärung im Text.)

Von dem Gedanken ausgehend, daß die bakterielle Hydrierung des TTC einen bestimmten Aktivitätszustand voraussetzt, wurden die mit *B. coli* bewachsenen Testplatten zur Regeneration der Reduktionsfähigkeit mit einer Glucoselösung überschichtet. Dabei zeigte sich, daß nach 1—2ständiger Vorbehandlung mit 2%iger Glucoselösung bei 37°C und anschließendem Zusatz 1%iger TTC-Lösung meist schon in 1 bis 2 min eine intensive Rotfärbung zu erreichen war. Man muß annehmen, daß der Zuckerzusatz die Stoffwechseltätigkeit der Bakterien wieder aufleben läßt und eine Aktivierung H-verschiebender Fermentsysteme bewirkt, auf deren Tätigkeit die Formazanbildung sehr wahrscheinlich zurückzuführen ist. Denn einfache SH-Verbindungen kommen für die Reduktion kaum in Frage, da beispielsweise TTC durch Cystein erst in stark alkalischem Bereich reduziert wird (BIELIG).



Wurde das TTC gleichzeitig mit der Zuckerlösung zur Kultur gegeben, dann trat die Rotfärbung langsamer ein und blieb an Intensität zurück. Aus dieser Beobachtung muß auf eine Beeinträchtigung des Bakterienstoffwechsels geschlossen werden, so daß von einem die lebende Zelle nicht schädigenden „Vitalfarbstoff“ im eigentlichen Sinne nicht gesprochen werden kann. BIELIG und Mitarb. haben schon darauf hingewiesen, daß bei langandauernder Einwirkung von TTC ein großer Teil der Keime abstirbt, weil TTC schwachen Invertseifencharakter besitzt (KUHN und JERSCHEL). Ein Zusatz von TTC zu frisch beimpften Röhrchen hatte gezeigt, daß schwache oder ausbleibende Färbung mit einer partiellen oder totalen Hemmung des Bakterienwachstums einhergeht.

Die Beziehungen zwischen Alter der Bakterien, Nährbodenverhältnissen und der Reduktion von TTC sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt. Die Versuche wurden mit *B. coli* auf Bouillon-Agar bei einer Bebrütungstemperatur von 37° C durchgeführt. Die TTC-Behandlung erfolgte bei den Kulturen auf reinem Bouillon-Agar (Spalten 2—4) in verschiedener Weise: Bei A ging dem Zusatz von TTC eine Zuckerbehandlung voraus, bei B kamen beide Lösungen gleichzeitig zur Anwendung, und bei C wurde allein mit TTC behandelt.

Tabelle 1.

TTC-Zusatz nach:	Reduktion von TTC durch <i>B. coli</i> auf:			
	1 Bouillon + 1% Glucose	2 Bouillon A	3 Bouillon B	4 Bouillon C
12 Std . . . . .	+++	+++	++	+ n. 7 Std
24 Std . . . . .	++	+++	++	—
36 Std . . . . .	+	+++	++	—
48 Std u. älter . . .	—	+++	++	—

Zeichen: Intensität der Rotfärbung nach einer Einwirkungszeit des TTC von 5 min.

+++ = stark; ++ = schwach; + = sehr schwach; — = fehlend.

Aus Spalte 1 ist zu entnehmen, daß auf einem Bouillon-Glucose-Agar noch nach 24 Std eine schwache Anfärbung zu beobachten war, wogegen auf einem reinen Bouillon-Nährboden mit TTC allein bei 12 Std alten Keimen erst nach 7stündiger Einwirkungszeit eine erkennbare, sehr schwache Rötung auftrat.

Die Einwirkung von Streptomycin (1 : 500) und Sublimat (5%) auf *B. coli* in auskeimendem Zustand ist in Abb. 1 dargestellt. Beide Stoffe führten unter diesen Versuchsbedingungen zur Bildung klarer, auch ohne Anfärbung sichtbarer Hemmzonen. Die beiden Platten links wurden nach 24stündiger Bebrütungszeit mit 1%iger TTC-Lösung behandelt und blieben — wie zu erwarten — wegen des in diesem Alter fehlenden

Reduktionsvermögens farblos. Die Platten rechts wurden 2 Std vor dem TTC-Zusatz mit 2%iger Glucoselösung vorbehandelt. Danach trat innerhalb von 2 min eine intensive Rotfärbung ein. Die Abb. 2 zeigt die entsprechenden Versuche mit 12 Std alten Kulturen. (Die Lösungen wurden also erst nach diesem zeitlichen Vorsprung der Bakterien getestet. Nach 12ständiger Einwirkung des Streptomycins bzw. Sublimats wurden die Platten in derselben Weise wie für Abb. 1 beschrieben mit TTC behandelt. Die Platten links (ohne Zuckerbehandlung) lassen keine Hemmzonenbildung erkennen, weil der Nährboden im Alter von 12 Std schon gleichmäßig bewachsen war und die 24 Std alten Keime TTC nicht mehr reduzierten. Auf den entsprechenden Platten rechts (mit Zuckerzusatz) sind die tatsächlich aufgetretenen Hemmzonen sichtbar gemacht. Bei dem stark bactericid wirkenden Sublimat (das gleiche trifft für Antibiotica mit ausgesprochen bactericiden Eigenschaften, wie sie z. B. Patulin besitzt, zu) zeichnet sich eine völlig ungefärbte Zone ab, während der entsprechende Versuch mit Streptomycin wegen der auf ältere Coli-Keime nur schwach bactericiden Wirkung dieses Stoffes eine mehr oder weniger, von der Konzentration abhängige, diffuse Hemmzone (vgl. Hemmzonentypen nach WALLHÄUSSER 1951) erkennen läßt.

### Zusammenfassung.

Kulturen von *B. coli* verlieren auf Bouillon-Nährböden schon nach einem Alter von 10—12 Std die Fähigkeit, Tetrazoliumsalze zu reduzieren. Damit ist die Möglichkeit, die Wirkung irgendwelcher Substanzen auf ältere Coli-Keime im Diffusionsplattentest durch Anfärben mit TTC zu ermitteln, normalerweise nicht gegeben. Es wird eine Methode beschrieben, die durch Zusatz von Glucose auch in solchen Fällen eine direkte Auswertung von Testplatten gestattet.

### Literatur.

- BIELIG, H. I., G. A. KAUSCHE u. H. HAARDICK: Z. Naturforschg. **4b**, 80 (1949). — KUHN, R., u. D. JERSCHER: Ber. dtsch. chem. Ges. **74**, 941 (1941). — WALLHÄUSSER, K. H.: Naturwiss. **37**, 450 (1950). — Arch. Mikrobiol. **16**, 201 (1951).



## Aufnahmebedingungen.

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photos.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Selbständige kritische Sammelreferate über einzelne Gebiete sind erwünscht.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse im Umfang von im allgemeinen höchstens 1 Seite anzufügen.

## Kurzes Lehrbuch der Anorganischen und Allgemeinen Chemie

Von Dr. **Gerhart Jander**, o. Professor an der Technischen Universität Berlin-Charlottenburg und Dr. **Hans Spandau**, Privatdozent an der Technischen Hochschule Braunschweig. Fünfte Auflage. Mit 169 Abbildungen. XII, 563 Seiten. 1952.

Ganzleinen DM 19,80

**Inhaltsübersicht:** Einleitung. 1. Grundbegriffe der Chemie und ihre Erklärung am Beispiel des Systems Wasser. 2. Die elementaren Bestandteile des Wassers. Ozon. Wasserstoffperoxyd. 3. Die Bestandteile der Luft. 4. Der Kohlenstoff. 5. Die Metalle. 6. Die Halogene. 7. Die Eigenschaften von Lösungen, insbesondere von wäßrigen Lösungen. 8. Die Chalkogene. 9. Gleichgewichtslehre. Massenwirkungsgesetz. 10. Das periodische System. Der Atombau. 11. Die Stickstoffgruppe. 12. Die 4. Hauptgruppe des periodischen Systems und das Bor. 13. Die Alkalien. 14. Zweite Hauptgruppe des periodischen Systems. 15. Die radioaktiven Elemente. 16. Dritte Hauptgruppe des periodischen Systems. 17. Die Nebengruppen des periodischen Systems. 18. Physikalische Untersuchungsmethoden als Hilfsmittel der anorganischen Chemie. 19. Die Katalyse. 20. Komplexverbindungen und Koordinationslehre. 21. Die Hydride. 22. Intermetallische Verbindungen, intermetallische Phasen. 23. Der kolloide Verteilungszustand der Materie. 24. Die Chemie der Hydrolyse und der höhermolekularen Hydrolyseprodukte (Polysäuren und Polybasen). Hochmolekulare anorganische Verbindungen. 25. Oxydhydrate und Hydroxyde. 26. Reaktionen im festen Aggregatzustand. 27. „Wasserähnliche“, anorganische Lösungsmittel. 28. Geochemie. Sachverzeichnis.

**SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG**



# Handbuch der inneren Medizin

Vierte Auflage

Herausgegeben von Professor Dr. **G. v. Bergmann**-München

Professor Dr. **W. Frey**-Bern und Professor Dr. **H. Schwegk**-Marburg a. d. Lahn

In 9 Bänden / Jeder Band ist einzeln käuflich

*Soeben erschienen:*

Erster Band in zwei Teilen

## Infektionskrankheiten

Bearbeitet von

R. Aschenbrenner · H. Baur · K. Bingold · H. Eyer · G. Fanconi · L. Fischer · E. Glanzmann · O. Gsell · F. O. Höring · H. Hormann · A. Hottinger · H. Kleinschmidt · F. Linder · H. Lippelt · W. Löffler · F. Lüthy · R. Massini · W. Minning · W. Mohr · D. Moroni · E. G. Nauck · E. Reichenow · H. Schlossberger · H. Schulten · H. Vogel · G. Walther · F. Weyer

### 1. Teil:

Mit 417 zum Teil farbigen Abbildungen. XVII, 1536 Seiten. 1952. Ganzleinen DM 204,—

### 2. Teil:

Mit 293 zum Teil farbigen Abbildungen. XV, 1225 Seiten. 1952. Ganzleinen DM 170,—

Bei Verpflichtung zur Abnahme des gesamten Handbuches Subskriptionspreis  
Band I, erster Teil Ganzleinen DM 163,—; Band I, zweiter Teil Ganzleinen DM 136,—

Die beiden Teile werden nur zusammen abgegeben

### Inhaltsübersicht:

Erster Teil: **Einleitung; Allgemeine Epidemiologie.** Von H. Schlossberger-Frankfurt a. M. und I. Eckart-Frankfurt a. M. — **Masern (Morbilli), Scharlach (Scarlatina), Röteln (Rubellen).** Vierte Krankheit. **Erythema infectiosum.** Das kritische Dreitagefieberexanthem der kleinen Kinder. **Exanthema subitum.** **Windpocken (Spitze Blattern, Varicellen).** **Der Schweißfriesel (Febris miliaris).** Von E. Glanzmann-Bern. — **Pocken (Blattern, Variola).** Von F. O. Höring-Worms. — **Parotitis epidemica (Mumps).** Von H. Kleinschmidt-Göttingen. — **Grippe (Influenza).** Von R. Massini-Basel und H. Baur-Basel. — **Schnupfen.** Von H. Baur-Basel. — **Herpes simplex (Febris herpetica).** Von H. Baur-Basel und R. Massini-Basel. — **Encephalitis (Selbständige Formen).** Von W. Löffler-Zürich und F. Lüthy-Zürich. — **Pollomyelitis und verwandte neurotrope Viruskrankheiten.** Von G. Fanconi-Zürich. — **Tollwut (Lyssa oder Rabies).** Von W. Mohr-Hamburg. Veterinärmedizinischer Teil von K. Enigk-Hamburg. — **Aujeszky'sche Krankheit.** Von W. Mohr-Hamburg. Veterinärmedizinischer Teil von K. Enigk-Hamburg. — **Tropische Viruskrankheiten.** Von E. G. Nauck-Hamburg. — **Rickettsiosen.** Von R. Aschenbrenner-Hamburg-Altona und H. Eyer-Bonn. — **Seltene Infektionskrankheiten, vorwiegend Zoonosen.** Von W. Mohr-Hamburg. Veterinärmedizinischer Teil von K. Enigk-Hamburg. — **Die Mykosen.** Von W. Mohr-Hamburg. — **Die septischen Erkrankungen.** Von K. Bingold-München. — **Erysipel.** Von K. Bingold-München. — **Die Anginen.** Von A. Hottinger-Basel. — **Infektiöse Mononukleose (Morbus Pfeiffer).** Von E. Glanzmann-Bern. — **Die Diphtherie.** Von A. Hottinger-Basel. — **Meningokokkeninfektionen.** Von O. Gsell-St. Gallen. — **Typhus abdominalis und Paratyphus.** Von K. Bingold-München.

Zweiter Teil: **Bacillenruhr.** Von G. Walther-Westerstede. — **Cholera asiatica.** Von E. G. Nauck-Hamburg. — **Die Brucellose.** Von W. Löffler-Zürich und D. L. Moroni-Zürich. — **Pest.** Von H. Hormann†. — **Tularämie.** Von H. Schulten-Köln-Merheim. — **Der Tetanus.** Von F. Linder-Berlin. — **Keuchhusten.** Von E. Glanzmann-Bern. — **Lepra.** Von W. Mohr-Hamburg. — **Leptospirosen.** Von O. Gsell-St. Gallen. — **Das Rückfallfieber** Von H. Lippelt-Hamburg. — **Die Rattenbisskrankheit (Sodoku).** Von H. Lippelt-Hamburg. — **Protozoenkrankheiten.** Von L. Fischer-Tübingen z. Z. Kabul/Afghanistan und E. Reichenow-Hamburg. — **Bartonellosis (Carriónsche Krankheit).** Von E. G. Nauck-Hamburg. — **Toxoplasmose.** Von W. Mohr-Hamburg. — **Arthropoden als Krankheitserreger und -überträger.** Von F. Weyer-Hamburg. — **Wurmkrankheiten.** Von H. Vogel-Hamburg und W. Minning-Hamburg. — **Namen- und Sachverzeichnis für Band I/1 und I/2.** — Jeder Abschnitt enthält ein Literaturverzeichnis.

**SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG**

Diesem Heft liegen 3 Prospekte des Springer Verlages, Berlin · Göttingen · Heidelberg, bei.

Springer-Verlag, · Berlin · Göttingen · Heidelberg. — Druck: Wiesbadener Graphische Betriebe GmbH.  
Printed in Germany.